



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2012

Daniel Sousa Duarte

Caraterização molecular da biodiversidade de *Vitis vinifera*



Universidade de Aveiro Departamento de Química

Ano 2012

Daniel Sousa Duarte

Caraterização molecular da biodiversidade de *Vitis vinifera*

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica Clínica realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Catarina Gomes, Investigadora Auxiliar da Unidade de Genómica do Biocant; e do Doutor Rui Vitorino, Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Este trabalho foi desenvolvido e financiado pelo projeto “InovWine”, uma iniciativa QREN, do financiamento UE/FEDER, através do COMPETE - Programa Operacional Factores de Competitividade, com a referência FCOMP-01-0202-FEDER-011498.

o júri

presidente

Prof. Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues
professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Maria Conceição Venâncio Egas
investigadora auxiliar da Unidade de Serviços Avançados do Biocant

Doutora Ana Catarina Batista Gomes
investigadora auxiliar da Unidade de Genómica do Biocant

Doutor Rui Miguel Pinheiro Vitorino
investigador associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Gostaria de agradecer à minha orientadora, Doutora Ana Catarina, pela sua orientação científica, disponibilidade, motivação e crítica ao longo deste projeto, bem como a oportunidade que me foi dada de realizar a Tese de Mestrado no Biocant, que contribuiu para enriquecer o meu percurso profissional e pessoal.

Ao Doutor Rui Vitorino, pela sua disponibilidade em ajudar-me em tudo o que necessitasse.

A todo pessoal da Unidade de Genómica do Biocant não só pelo bom ambiente de trabalho, mas também do espírito de entreajuda e claro, pelos bons momentos de descontração. Mesmo naqueles dias em que estamos mais em baixo, conseguem tirar um sorriso da nossa cara.

Aos meus amigos e amigas pelos momentos de boa disposição.

E como não podia deixar de ser aos meus pais e irmã, pelo seu apoio incondicional e força que me deram ao longo destes anos. A eles demonstro a minha gratidão eterna.

Palavras-chave

Vitis vinifera, castas, clones, marcadores moleculares

Resumo

A videira é uma das espécies frutíferas mais importantes a nível mundial. Dentro do género *Vitis*, a *Vitis vinifera* representa a espécie mais importante e mais utilizada para a produção de vinho, e apresenta muitas variedades, quer a nível de castas, quer ao nível dos clones. A sua grande variabilidade morfológica, metabólica e genética por um lado apresentam-se como uma vantagem, como um fator diferenciador, mas por outro lado dificulta a identificação de castas e clones de videira. Deste modo, a diferenciação inter e intra castas é de extrema importância para os vários agentes económico: o viveirista, o agricultor, as adegas a até consumidores, dado que a qualidade do vinho, entre outros fatores, depende da casta/clone utilizada.

Desta forma, a identificação molecular de *V. vinifera* apresenta-se como uma ferramenta de extrema utilidade para a identificação inequívoca das videiras. Atualmente, esta é feita com microssatélites (SSRs). Neste trabalho procurou-se explorar o potencial dos *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) como marcadores moleculares. Para tal, selecionaram-se 32 regiões do genoma de *V. vinifera* que foram testados em 10 castas distintas, com 2 clones de cada casta.

Neste trabalho, identificaram-se um total de 103 SNPs que permitem discriminar as castas estudadas, muito embora não tenham a capacidade de diferenciar os clones. Contudo, dos 103 SNPs, verificou-se que bastariam 12 SNPs para discriminar as 10 castas estudadas.

Em conclusão, este estudo confirma o potencial de utilização dos SNPs como ferramenta moleculares para a discriminação de castas de *V. vinifera*.

Keywords

Vitis vinifera, variety, clones, molecular markers

Abstract

Grapevine is one of the world's most important fruit species. Within the genus *Vitis*, *Vitis vinifera* is the species that represents the most important and used for the production of wine. This specie includes many varieties and clones. The morphological, metabolic and genetic variability on one hand appear as an advantage, as a differentiating factor, but on the other hand, it is difficult to identify varieties and clones of the grapevine. Thus, the differentiation within and between varieties is extremely important for various economic agents: the nursery, the farmer, the wineries and ultimately the consumers, since the quality of wine, among other factors, depends on the variety/clone used.

Therefore, the molecular identification of *V. vinifera* is of utmost importance for the unequivocally identification of the grape varieties.

Currently this is done with microsatellites (SSRs). In this study we investigate the potential of the Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) as molecular markers. For this purpose, we selected regions of the genome of 32 *V. vinifera* that were tested on 10 different varieties, 2 clones from each variety.

In this study, we identified a total of 103 SNPs that allow us to discriminate the varieties studied, although it does not have the ability to differentiate clones. From the 103 SNPs that were identified, it was found that 12 of them were enough to discriminate all the 10 cultivars studied.

In conclusion, this study confirms the potential use of SNPs as molecular tool for the discrimination of varieties of *V. vinifera*.

Índice

1	Introdução	3
1.1	Importância da videira e a sua classificação botânica	3
1.2	Diversidade de <i>Vitis vinifera</i>	4
1.3	Clones e variação clonal	5
1.4	Avaliação da diversidade genética usando marcadores.....	8
1.4.1	Marcadores morfológicos	8
1.4.2	Marcadores bioquímicos	9
1.4.3	Marcadores moleculares	10
1.4.3.1	Marcadores baseados em técnicas de restrição	11
1.4.3.2	Marcadores baseados em técnicas de amplificação.....	12
	• Random amplified polymorphic DNA (RAPD).....	12
	• <i>Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)</i>	13
	• Marcadores baseados em microssatélites.....	14
	• Marcadores Microssatélites em Videira (<i>Vitis</i> spp.).....	15
	• <i>Single Nucleotide Polymorphism (SNP)</i>	17
2	Objetivos.....	23
3	Material e Métodos.....	27
3.1	Recolha de amostras	27
3.2	Extração de ADN genómico de videira	27
3.3	Quantificação do ADN	28
3.4	SNPs	28
3.4.1	Seleção de SNPs	28
3.4.2	Desenho dos <i>primers</i>	28

3.4.3	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	29
3.4.4	Eletroforese dos produtos de amplificação	29
3.4.5	Purificação dos fragmentos amplificados	30
3.4.6	Genotipagem de SNPs	30
3.4.7	Análise dos dados	31
3.4.8	Construção das árvores filogenéticas.....	31
3.5	Microsatélites.....	32
3.5.1	Seleção e teste de <i>Primers</i>	32
3.5.2	<i>Multiplex</i>	32
3.5.3	PCR em <i>Multiplex</i>	33
3.5.4	Análise de Fragmentos.....	34
3.5.5	Construção das árvores filogenéticas.....	34
4	Resultados e Discussão	37
4.1	Introdução	37
4.2	Seleção e otimização de regiões polimórficas de <i>V. vinifera</i>	37
4.3	Genotipagem de <i>V. vinifera</i> utilizando SNPs.....	44
4.4	Genotipagem de <i>V. vinifera</i> usando microsatélites	52
5	Conclusão.....	57
6	Referências bibliográficas	61

Anexo

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Análise comparativa entre alguns marcadores moleculares.....	20
Tabela 2 – Nomes, sequência de <i>primers</i> , tamanho e repetição dos microssatélites utilizados na identificação de castas. Os 14 loci de microssatélites estão divididos em 3 <i>multiplexs</i>	32
Tabela 3 – <i>Primers</i> em <i>multiplex</i> com as concentrações otimizadas de cada um	33
Tabela 4 – Caracterização dos SNPs utilizados no estudo	38
Tabela 5 – Lista de <i>primers</i> utilizados para amplificar os fragmentos que contêm os SNPs. Na tabela está representada o nome do <i>primer</i> (F – <i>Forward</i> ; R - <i>Reverse</i>), a sequência, a temperatura de <i>annealing</i> e o tamanho do amplicão	40
Tabela 6 – Castas utilizadas no estudo.....	43

Lista de Figuras

Figura 1 – Exemplo de uma mutação pontual (SNP) observado em seis indivíduos. A mutação pontual corresponde a uma transição purina-purina ($A \Leftrightarrow G$) e encontra-se destacada.	18
Figura 2 – Localização dos SNPs em estudo	38
Figura 3 – Teste de amplificação aos <i>primers</i> em gel de agarose 1%. Na extremidade está o marcador de peso molecular NZYDNA Ladder I (NZYTech). Para este teste utilizou-se um ADN de videira (Bical-3).....	42
Figura 4 – Teste de amplificação aos <i>primers</i> em gel de agarose 1%. Na extremidade está o marcador de peso molecular NZYDNA Ladder I (NZYTech). Para este teste utilizou-se um ADN de videira (Bical-3).....	42
Figura 5 – Otimização dos pares de <i>primers</i> SNP12, SNP19, SNP30 e SNP32.....	43
Figura 6 – Exemplo de um eletroferograma obtido por genotipagem do SNP24 de três indivíduos diferentes: A, B e C. O indivíduo A é homozigótico para o alelo C, o indivíduo B é homozigótico para o alelo T e o indivíduo C é heterozigótico	45
Figura 7 – Sequências alinhadas para a região SNP24. A primeira sequência corresponde à sequência que está descrita na literatura. Os pontos (.) correspondem a zonas conservadas. Na posição 101 encontra-se o SNP [C/T] e na posição 142 o SNP [G/T].	46
Figura 8 – Fingerprint obtida após a deteção de todos os SNPs em todas as amostras. R (A/G); W (A/T); S (G/C); K (T/G); M (C/A); N (nucleótido desconhecido).	47
Figura 9 – Dendrograma obtido resultante da análise dos 103 SNP. Análise efetuada com o programa Phylogeny.fr. Número de bootstraps igual a 500.....	48
Figura 10 – Dendrograma obtido resultante da análise do SNP9, contendo 10 SNPs. Análise efetuada com o programa Phylogeny.fr. Número de bootstraps igual a 500.....	50
Figura 11 – Dendrograma obtido resultante da análise de duas regiões (SNP9 e SNP16), que correspondem no total 12 SNPs. Análise efetuada com o programa Phylogeny.fr. Número de bootstraps igual a 500.	51
Figura 12 – Dendrograma obtido resultante da análise dos 14 loci de microssatélites. Análise efetuada com o <i>software</i> BioNumerics (Applied Maths) de acordo com o método	

UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) e o coeficiente de similaridade de *Pearson correlation*. Número de bootstraps igual a 1000.....54

Lista de Siglas

®	Marca registada
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
A	Adenina
a.C.	antes de Cristo
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
bp	<i>Base pair</i>
C	Citosina
CAN	Colecção Ampelográfica Nacional
ADN	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatados
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EtBr	Brometo de etídio
g	Gramma
G	Guanina
H ₂ O	Água
Hz	Hertz
L	Litro
M	Molar
mg	Miligrama
Mg ²⁺	Ião magnésio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NaOH	Hidróxido de sódio
°C	Graus Célcus
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>

RAPD	<i>Random amplified polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNase A	Ribonuclease A
RPM	Rotações por minuto
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SSR	<i>Simple Sequence Repeats</i>
STR	<i>Short Tandem Repeats</i>
T	Timina
Ta	Temperatura de <i>annealing</i>
TA	Temperatura ambiente
TAE	Tris-Acetato-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
Tm	Temperatura de <i>melting</i>
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
U	Unidades de enzima
UV	Ultravioleta
V	Volt
vs	versus

I. Introdução

1 Introdução

1.1 Importância da videira e a sua classificação botânica

A videira é uma das espécies frutíferas mais importantes a nível mundial [1-3], com mais de 60 milhões de toneladas de uvas produzidas anualmente. A Europa é o continente onde há maior produção de uvas (50%), seguida pela Ásia (23%), América (20%), África (5%) e por fim Oceânia (2%). Da produção total de uva, 70% é usado para o vinho, 22% para uvas de mesa, e 8% para passas; sendo outros produtos transformados em compotas e geleias e apenas de interesse e exploração local [2]. Em Portugal, o sector vitivinícola desempenha um papel económico e social de grande relevo, sendo o nosso país o 10º produtor mundial e 5º produtor europeu [2, 4, 5].

A videira pertence à classe das angiospérmicas e à família de Vitaceae. A família Vitaceae é composta por quase mil espécies, agrupadas em dezassete géneros. Dentro do género da *Vitis*, a *Vitis vinifera* é a espécie mais importante e mais utilizada para a produção de vinho [1, 6]. O género *Vitis* divide-se em dois subgéneros: *Muscadinia* e *Euvitis* [6, 7]. Esta divisão deve-se às diferenças anatómicas e morfológicas que as suas espécies apresentam. As plantas com 40 cromossomas ($2n=40$) são agrupadas no subgénero *Muscadinia*. Este subgénero engloba espécies como a *V. rotundifolia*, *V. munsoniana* e *V. popenoei*. Destas destaca-se a *V. rotundifolia* como a mais importante do ponto de vista de resistência a *stress* biótico e abiótico. O subgénero *Euvitis* reúne plantas com 38 cromossomas ($2n=38$), onde se encontram duas espécies de vital importância económica para a agricultura (*V. labrusca* e *V. vinifera*.), quer seja para a produção de vinho, ou para o consumo *in natura* das frutas. A *V. labrusca* é uma espécie de origem americana e apresenta características mais rústicas quanto à suscetibilidade a doenças [6]. A *V. vinifera* é a espécie indígena da Europa e da Ásia Central europeia e é responsável por mais de 90% dos vinhos produzidos. [3, 6].

A espécie *V. vinifera* pode ser ainda dividida em duas subespécies: a subespécie *Vitis vinifera* spp. *sativa* e a subespécie *Vitis vinifera* spp. *sylvestris*. A primeira, representa a forma cultivada e foi domesticada a partir de populações selvagens da subespécie *Vitis vinifera* spp. *sylvestris* à 4000-6000 anos (a.C.) na Transcaucásia. A segunda subespécie é rara e pode-se encontrar em Portugal, França, Itália, Alemanha e em outros países

Europeus [6, 8]. Durante a domesticação, a biologia das uvas sofreu alterações dramáticas para assegurar maior conteúdo de açúcar para uma melhor fermentação. Neste processo ocorreram alterações na morfologia da semente da videira, no tamanho das uvas e cacho e ainda a alteração nas estruturas reprodutoras. Antes da domesticação as estruturas reprodutoras masculinas e femininas encontravam-se em indivíduos de plantas diferentes, porém, após a domesticação, as estruturas reprodutoras masculinas e femininas encontram-se na mesma planta o que permite a autofecundação [3, 9].

1.2 Diversidade de *Vitis vinifera*

A espécie *V. vinifera* compreende muitas variedades, quer a nível de castas, quer a nível de clones. As castas tanto podem exibir diferenças a nível de morfologia, de adaptação a diferentes climas, na produção de diferentes compostos aromáticos, etc. Por isso, as castas estão diretamente associadas à qualidade do vinho [1].

O número de diferentes castas mantidas em bancos de germoplasma no mundo é de aproximadamente 10 mil [3, 10, 11]. Em Portugal existe a Colecção Ampelográfica Nacional (CAN) que é composta por 450 espécies de *Vitis vinifera* spp. *sativa* muitas das quais são típicas de Portugal, ou de uma das suas regiões, enquanto que outras castas são internacionais, cuja expansão se tem verificado nos últimos anos [12]. Destas, 313 castas estão oficialmente autorizadas para a produção de vinho. Esta coleção permite preservar o material vegetal vivo e desta forma que se realizem quer estudos ampieográficos, quer estudos moleculares. Adicionalmente, permite preservar as castas tradicionais Portuguesas [13].

A grande diversidade de variedades de *Vitis vinifera* tem origem em processos de cruzamentos espontâneos ou controlados, de domesticação das videiras selvagens e em programas de melhoramento vegetal [14]. A plantação de sementes e a reprodução sexual tiveram um papel importante na domesticação e na expansão da vinicultura para novas regiões [3]. Como as videiras têm genótipos altamente heterozigóticos, a descendência produzida a partir de sementes resulta numa nova combinação de alelos dos pais, resultando numa variação fenotípica na descendência [3].

Embora exista uma grande diversidade na *V. vinifera*, presume-se que a diversidade que atualmente existe represente uma pequena percentagem da diversidade que existia antes da propagação de agentes causadores de doenças no final do século XIX. O afídio *Phylloxera vastatrix* (*Daktulosphaira vitifoliae*) foi o principal agente responsável pela

devastação e destruição de muitas quintas de vinho na Europa e isto levou a uma redução drástica da biodiversidade da forma cultivada e também da forma selvagem [3, 15, 16]. A viticultura europeia foi salva da extinção com a introdução de várias espécies *Vitis* não-*viniferas* Americanas, que são resistentes ao afídio e por isso são usados como porta-enxertos [3].

Razões económicas e a globalização dos mercados de vinhos são outros fatores que nos últimos 50 anos contribuíram na diminuição da biodiversidade da *V. vinifera*. Estes dois fatores resultaram na exploração de apenas algumas castas como por exemplo, Chardonnay, Cabernet Sauvignon, Syrah, Merlot e Pinot noir. Outras castas existentes são menos exploradas e muitas outras têm apenas importância regional. Contudo, esta diversidade pode também ser sinónima de identidade, e atualmente observa-se um regresso às origens com a procura de elementos diferenciadores que tragam mais-valias económicas [3].

Em suma, a espécie *V. vinifera* caracteriza-se por ter uma grande variabilidade morfológica e genética e isto constitui um problema para a identificação de castas de videira originando confusão e ambiguidade na sua distinção. Assim, a identificação e caracterização das variedades de videira são importantes para os viticultores e empresas vinícolas, pois a qualidade e quantidade da produção do vinho são determinadas pela variedade cultivada [5]. Além disso, a identificação correta permite a manutenção do valor das castas utilizadas e evita o potencial uso abusivo de nomes prestigiados em produtos adulterados [5]. Por outro lado, como a maioria das adegas não controla a produção de uvas, é necessário um método que permita determinar o tipo de castas entregues nas mesmas.

1.3 Clones e variação clonal

Um clone é definido como um indivíduo que descendeu a partir de um ancestral por mitose. Um grupo de clones provenientes de um mesmo ancestral (monozigótico) é definido como sendo geneticamente igual, exceto quando ocorrem mutações [17].

Na viticultura, um clone refere-se a uma variedade de videira que é selecionada pelas suas características específicas, como por exemplo resistência a determinadas doenças, cor da uva, aroma do vinho, etc. Os clones obtêm-se através da propagação vegetativa, uma forma de reprodução assexuada em plantas, através do qual se multiplicam clones

geneticamente idênticos à planta original. A propagação vegetativa tem sido o método preferido para preservar as características originais da variedade e tem sido usado desde os tempos romanos [18]. As variedades da videira consistem em conjuntos de clones descendentes a partir de uma única videira. A maioria dos clones dentro de uma variedade são idênticos, mas alguns podem mostrar genótipos e fenótipos, distintos [18].

A casta Pinot é um exemplo típico, onde se verifica uma grande diversidade fenotípica entre os clones [18]. O elevado grau de diversidade de Pinot manifesta-se em características como cor da baga (por exemplo, Pinot noir, e Pinot blanc), pele e polpa pigmentadas (Pinot teinturier), produtividade (por exemplo, Pinot fin vs Pinot moyen), ausência de cera nas bagas (Pinot moure) entre outras [18]. Além das diferenças fenotípicas que se podem verificar entre os clones, outras características como pH, acidez, têm sido verificados em diferentes clones da mesma casta. Anderson *et al.* [19] mediram ao longo de três períodos de crescimento, entre 1999 e 2001 qualidades como pH e acidez em 20 clones da casta Pinot. Os autores verificaram que esses parâmetros diferiram significativamente entre os clones.

Outras características como o aroma do vinho, também podem ser afetadas por variações fenotípicas, como é o caso da casta, Chardonnay. Esta casta possui dois clones certificados que dão origem a vinhos com diferentes perfis aromáticos. Assim, o clone Chardonnay 76 especifica-se como sendo neutro, enquanto o clone Chardonnay 809 distingue-se pelo seu aroma “muscat”. Este aroma é devido à produção de linalol em concentrações significativamente mais elevadas [20]. Da mesma forma, os clones da casta Savagnin produzem vinhos aromáticos ou vinhos neutros e são classificados como sendo originários de três castas diferentes: o clone Gewürztraminer (bagas cor de rosa/vinho aromático), o clone Savagnin pink (bagas cor de rosa/vinho neutro) e o clone Savagnin blanc, também conhecido como Traminer (bagas branco/vinho neutro). O aroma do clone Gewürztraminer é o resultado de seu conteúdo em geraniol, que se encontra em concentrações maiores do que os outros dois clones [20].

As diferenças entre os clones podem resultar de modificações epigenéticas em resposta ao ambiente [21] ou da presença de agentes fitopatológicos, como vírus [22]. Os vírus (patogénicos ou não), adquiridos dentro de uma vinha ou quando não detetadas no tempo da propagação das mesmas, tem o potencial de transferir fragmentos de ADN

utilizando vetores tais como *Agrobacterium* (bactéria presente nos solos das vinhas), contribuindo assim na variabilidade intra-casta [7].

No entanto, as diferenças fenotípicas que se verificam entre os clones devem-se principalmente a mutações que ocorrem naturalmente durante o crescimento da videira [23]. As mutações somáticas em termos de variação clonal são diferenças na sequência nucleotídica do material genético entre os clones. Se as células afetadas forem as meristemáticas, as mutações irão estar presentes em todos os órgãos e tecidos que se desenvolvem a partir dessas células. As mutações podem ser classificadas em diferentes categorias. Em termos de efeitos na estrutura, as mutações podem ser de pequena escala (mutações pontuais, inserções curtas, exclusões, etc.) ou de grande escala (amplificações, grandes deleções, rearranjos cromossômicos, etc.). Em termos de fenótipo, as mutações podem ser silenciosas ou funcionais. As mutações silenciosas não afetam a atividade genômica funcional, enquanto as mutações funcionais podem afetar a regulação e controle genético, alterar vias enzimáticas (mutações bioquímicas) ou gerar diferenças no aspeto externo de um organismo (mutações morfológicas) [24].

Até agora algumas mutações têm-se mostrado responsáveis por polimorfismos em clones. Por exemplo, Boss e Thomas [25] identificaram uma mutação pontual no domínio DELLA num dos alelos do gene *VvGAI1*. Esta mutação leva à substituição de um resíduo de leucina no domínio conservado DELLA para um resíduo de histidina. A alteração de um aminoácido apolar pequeno (leucina) para um aminoácido básico maior (histidina) altera as propriedades da proteína em resposta às giberelinas. Esta mutação é responsável pelo fenótipo anão do clone Pinot meunier.

Também foi demonstrado que os clones se adaptam de forma diferente para determinadas condições climáticas e solos. Essa adaptação poderá resultar numa maior ou menor produção de uvas [26, 27].

Como diferentes clones têm diferentes características, que se podem traduzir em diferentes conteúdos de açúcar, acidez, diferentes aromas e diferentes capacidades adaptativas, é importante consegui-los identificar. Assim, quando um viticultor escolhe um clone, pode decidir sobre um tipo de vinho específico que pretende produzir, selecionando um clone com os parâmetros de qualidade requeridos e também saber se esse clone se encontra adaptado às condições climáticas da vinha do viticultor.

Como consequência, há uma necessidade de métodos fiáveis e precisos que consigam distinguir inequivocamente uma casta ou um clone. Nos últimos anos têm sido usados marcadores morfológicos, bioquímicos e moleculares na identificação de castas e clones de videira.

1.4 Avaliação da diversidade genética usando marcadores

Os marcadores desempenham um papel essencial no estudo da variabilidade e diversidade, na construção de mapas genéticos, e no diagnóstico [28].

1.4.1 Marcadores morfológicos

A identificação de variedades de videira tem sido tradicionalmente baseada na ampelografia. Este método baseia-se na descrição das características morfológicas durante as diferentes fases de desenvolvimento de plantas [29-31]. Este método pode ser considerado como marcador de fenótipos ou marcador morfológico. As características morfológicas resultam da expressão dos genes, logo podem fornecer uma ideia sobre o genótipo [32]. Com base na análise de critérios ampelográficos, mais de 6000 castas estão atualmente identificadas. Todavia, existem várias limitações utilizando estes métodos:

- (i) Os fenótipos de plantas são fortemente influenciados pelas condições ambientais, estado nutricional e estado de saúde. Diferentes ambientes podem causar variação nas características morfológicas e a identificação de plantas infetadas, subnutridas ou de outra forma atípica são suscetíveis a erros.
- (ii) O número de castas mantidas em coleções ampelográficas no mundo é de aproximadamente 10 mil. Mesmo que as plantas estivessem em ótimas condições, seria extremamente difícil diferenciar todas as variedades através de características morfológicas.
- (iii) A aplicação de métodos ampelográficos requerem profissionais qualificados, que, no entanto, não conhecem nem tem acesso aos milhares de diferentes castas utilizadas no mundo, simplesmente porque nenhuma coleção pode conter de forma exaustiva todos os recursos genéticos existentes. Os especialistas em ampelografia geralmente reconhecem castas da sua região e não estão familiarizados com os de outras regiões. Além

disso, a reprodutibilidade e a padronização das observações entre ampelógrafos têm sido difíceis de alcançar.

- (iv) Este método só pode ser aplicado durante o período vegetativo. Conquanto, o material vegetal da videira é comercializado na forma de canas de madeira o que torna quase impossível a identificação de castas e de clones. De tal modo, são necessários diversos anos após uma plantação de vinha para detetar um erro de uma atribuição falsa de uma casta ou de um clone.
- (v) São marcadores dominantes, não permitindo a distinção de indivíduos homozigóticos dos indivíduos heterozigóticos.
- (vi) A utilização destes marcadores exclui a análise de sequências não codificantes, que por sua vez representa mais de 95% do genoma total em plantas.

Por estas razões, são necessários métodos alternativos que exponham melhores diferenças entre clones da videira.

1.4.2 Marcadores bioquímicos

Os marcadores bioquímicos incluem proteínas, isoenzimas e metabolitos secundários e têm sido utilizados por mais de 60 anos para estimar a variabilidade genética e taxonómica, caracterização de recursos genéticos e em programas de melhoramento de plantas [33]. As isoenzimas são enzimas com a mesma função catalítica mas que diferem a nível estrutural e resultam da alteração dos aminoácidos. A alteração dos aminoácidos altera a carga global e a conformação da enzima bem como a mobilidade eletroforética. Quando uma mutação no ADN resulta numa substituição de um aminoácido, a carga global e a conformação da proteína podem sofrer alterações. Como a taxa de migração das proteínas depende da carga global e da conformação da proteína, as variantes alélicas podem ser detetadas através de um gel de eletroforese. [33].

A utilidade de vários sistemas enzimáticos na análise de isoenzimas na videira foi avaliada por Benin *et al.* [34], Eiras-Dias *et al.* [35] e Calo *et al.* [36]. Apesar de tudo, a expressão de enzimas pode depender da fase de desenvolvimento da planta e das condições ambientais [30]. Consequentemente, só podem ser considerados marcadores isoenzimáticos, as enzimas que não mostram variações sob diferentes condições [30]. Isto

limita o número de marcadores enzimáticos disponíveis e, conseqüentemente, restringe o grau de polimorfismo e a capacidade de diferenciação de castas através da análise de isoenzimas [30, 33, 37, 38]. Outra desvantagem do uso destes marcadores, é a necessidade utilização de material vegetal fresco, em fases de desenvolvimento semelhantes, o que o apenas permite revelar polimorfismos funcionais [30, 32, 33].

1.4.3 Marcadores moleculares

O passo seguinte no desenvolvimento de marcadores baseou-se na análise ao ADN, devido às suas propriedades estruturais e bioquímicas, idênticas em todas as células de qualquer tecido e em qualquer fase de desenvolvimento [30].

Um marcador molecular pode ser definido como um locus genómico, detetado através de sondas ou de sequências específicas (*primers*) que distinguem inequivocamente a característica cromossómica que ela representa [39]. Os marcadores moleculares permitem realçar diferenças (polimorfismos) numa sequência de ADN entre indivíduos diferentes. Estas diferenças incluem inserções, deleções, translocações, duplicações e mutações pontuais [39]. Os marcadores moleculares têm a vantagem de ser aplicáveis a qualquer parte do genoma (intrões, exões e regiões reguladores) e, portanto, oferecem uma grande extensão de polimorfismos; não possuem efeitos pleiotrópicos ou epistáticos e, ao contrário dos marcadores morfológicos e bioquímicos, são capazes de distinguir polimorfismos que não produzem uma variação fenotípica; são passíveis de automação; permitem a deteção simultânea de alelos recessivos dominantes; e não são influenciados por condições ambientais. Assim, a análise ao ADN é desprovido de qualquer tipo de limitações externas [30, 33, 39]. Além do mais, o ADN pode ser obtido a partir de qualquer tipo tecido vegetal disponível e as análises podem ser realizadas em qualquer época do ano [33].

Um marcador molecular ideal deve possuir então as seguintes características:

- (i) Ser polimórfico e uniformemente distribuído por todo o genoma.
- (ii) Ter uma metodologia de detecção rápida e económica.
- (iii) Requerer pequenas quantidades de ADN.
- (iv) Ter uma elevada reprodutibilidade.

Contudo, é extremamente difícil encontrar um marcador molecular, que reúna todos os critérios acima referidos. Os diferentes tipos de marcadores moleculares hoje disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada para detetar a variabilidade no ADN, (expressão génica, distribuição no genoma, etc.), sendo que as diferentes tecnologias estão associadas a diferentes custos. O uso desses marcadores é uma metodologia muito utilizada para complementar a ampelografia, identificar sinónimos e estabelecer relações genéticas entre as variedades de videira [33, 39].

Os diferentes marcadores podem avaliar um locus (“single-locus”) ou vários loci ao mesmo tempo (multi-locus). Os marcadores multi-locus permitem a análise simultânea de vários loci genómicos e baseiam-se na amplificação aleatória dos loci através de *primers* com sequências aleatórias. Os marcadores multi-locus são dominantes uma vez que é possível observar a presença ou ausência de uma banda para qualquer um dos locus testado, mas não é possível distinguir entre indivíduos homozigóticos e heterozigóticos para o mesmo alelo. Por outro lado, os marcadores “single-locus” utilizam sondas ou *primers* específicos capazes de hibridizar ou amplificar regiões do ADN conhecidas. Estes são marcadores codominantes uma vez que permitem discriminar entre indivíduos homozigóticos e heterozigóticos para o mesmo alelo [39].

Os diferentes marcadores podem ser classificados em duas categorias: (i) marcadores baseados em técnicas de restrição e (ii) marcadores baseados em técnicas de PCR.

1.4.3.1 Marcadores baseados em técnicas de restrição

Os marcadores moleculares que se baseiam na restrição de ácidos nucleicos foram utilizadas relativamente cedo no campo das plantas e utilizam endonucleases de restrição. As endonucleases são enzimas bacterianas capazes de cortar o ADN, identificando sequências palindrómicas específicas, produzindo fragmentos com tamanhos variáveis.

Qualquer alteração dentro da sequência do ADN (exemplo mutações pontuais), ou mutações no local da atuação da enzima podem gerar variações no comprimento do fragmento obtido após digestão enzimática [30, 33, 39, 40].

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) é um exemplo de marcador molecular baseado na técnica de restrição. Neste, o polimorfismo de ADN é detetado se se verificar um perfil de fragmentos diferencial após digestão com a enzima de restrição. Os marcadores RFLP apresentam um elevado grau de polimorfismo, são codominantes e permitem a triagem simultânea de várias amostras. A análise efetuada com este marcador foi anteriormente realizada com sucesso na deteção de assinaturas moleculares específicas para a distinção das variedades da videira [41-43]. Em comparação com os marcadores bioquímicos, o método RFLP oferece vantagens como uma maior robustez para diferentes condições ambientais e uma maior capacidade em detetar polimorfismos [30]. Porém, obtém-se padrões de bandas complexos, o que pode causar dificuldades na interpretação dos resultados que requerem grandes quantidades de ADN de alta qualidade [30, 33, 39, 40].

1.4.3.2 Marcadores baseados em técnicas de amplificação

O desenvolvimento da PCR permitiu a utilização de novos marcadores moleculares. A utilização de *primers* com sequências aleatórias superou a limitação do conhecimento prévio da sequência a amplificar e facilitou o desenvolvimento de marcadores genéticos com diferentes finalidades. As técnicas baseadas na PCR podem ser subdivididas em duas categorias: (i) técnicas de amplificação não específica e (ii) técnicas de amplificação específica. É com base nesta subdivisão que dois tipos de marcadores moleculares têm sido desenvolvidos: RAPD e AFLP [44, 45].

- **Random amplified polymorphic DNA (RAPD)**

Os RAPDs foram os primeiros marcadores moleculares baseados na técnica de PCR a serem utilizados em análises de variação genética [39, 46, 47]. Estes marcadores são gerados através da amplificação aleatória do ADN genómico utilizando *primers* curtos (entre 4 a 6 nucleótidos) e posteriormente os fragmentos gerados são separados por eletroforese. O padrão de gel dos fragmentos produzidos é característico de um dado organismo. Se dois organismos têm o mesmo padrão, são considerados do mesmo tipo. Se os padrões são diferentes, são tipos diferentes. Os polimorfismos de ADN são produzidos

através dos rearranjos ou deleções no ou entre os locais de ligação dos *primers* ao ADN genómico. Como esta abordagem não exige nenhum conhecimento prévio do genoma a ser analisado, pode ser aplicado virtualmente em todas as espécies utilizando *primers* universais [39].

Devido à rapidez e eficiência dos marcadores RAPDs foram desenvolvidos mapas genéticos de elevada densidade em várias espécies de plantas como a *Medicago sativa* (luzerna) [48], a *Vicia faba* (fava) [49], a *Malus domestica* (maçã) [50] e a *Vitis vinifera* (videira) [51]. A técnica RAPD é rápida, barata e tem sido utilizado para a deteção de diferenças genéticas entre organismos. Na videira, foram detetados vários polimorfismos recorrendo a estes marcadores [52-55]. A principal desvantagem deste método é a dependência de condições experimentais restritas [30, 33, 39]: diferentes termocicladores, polimerases e concentrações de *primer* bem como diferentes operadores que podem influenciar os resultados. Além disso como vários loci são amplificados, por cada par de *primer*, os perfis obtidos não permitem distinguir entre indivíduos homozigóticos e heterozigóticos [33, 39].

- ***Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)***

Para superar o problema da reprodutibilidade associada ao marcado RAPD, foi desenvolvido o marcador AFLP. A análise de AFLP baseia-se na amplificação seletiva, via PCR, de um subconjunto de fragmentos genómicos gerados após digestão com uma enzima de restrição cujo reconhecimento da sequência aparece poucas vezes no genoma, combinado com outra enzima de restrição cujo reconhecimento da sequência aparece várias vezes no genoma. Pode ser considerado como um intermédio entre as metodologias RFLPs e as metodologias RAPDs pois combina o poder do RFLP e a flexibilidade da técnica de PCR [44, 45].

Estes são marcadores universais, pois permitem obter impressões digitais de qualquer ADN, independentemente da sua origem, sem o conhecimento prévio do genoma. A maioria dos fragmentos que se obtêm utilizando esta técnica correspondem a posições únicas no genoma e portanto podem ser utilizados como pontos de referência no mapeamento genético e físico. Existem vários fatores que podem levar ao aparecimento ou desaparecimento de bandas, tais como mutações no local de restrição, mutações das sequências que estão a flanquear o local de restrição, bem como inserções e deleções [39]. A principal vantagem desta tecnologia é o grande número de fragmentos que são gerados

simultaneamente, aumentando o poder de detecção de variabilidade genética. Por esta razão, esta técnica tem sido utilizada principalmente no estudo da diversidade genética entre indivíduos e na construção de mapas genéticos e mapeamento de genes de interesse em diferentes espécies [39, 56]. Em *V. vinífera*, estes marcadores têm sido ainda utilizados para avaliar o grau de relação e a variabilidade entre castas [57, 58], porém o facto de serem marcadores dominantes, não permitem a detecção de alelos recessivos em heterozigóticos [44].

- **Marcadores baseados em microssatélites**

No fim dos anos 80, os microssatélites, foram detetados simultaneamente por três grupos de cientistas [59-61]. Os microssatélites, também conhecido como *Simple Sequence Repeats* (SSR) ou *Short Tandem Repeats* (STR), são regiões não codificantes do ADN compostas por pequenos motivos de 1-6 nucleótidos que se repetem em tandem. Estes marcadores podem ser classificados como perfeito, imperfeito, interrompido ou composto. Num microssatélite do tipo perfeito, a repetição da sequência não é interrompida por qualquer base não pertencentes ao motivo (por exemplo, TATATATATATATATA), enquanto num microssatélite imperfeito, há um par de bases entre os motivos repetidos que não coincide com a sequência motivo (por exemplo, TATATATACTATATA). No caso de um microssatélite interrompido há uma sequência pequena dentro da sequência repetida que não coincide com a sequência motivo (por exemplo TATATACGTGTATATATATA), enquanto num microssatélite composto, a sequência contém duas sequências distintas adjacentes que se repetem (por exemplo, TATATATATAGTGTGTGTGT) [62].

A existência de sequências repetidas em tandem no ADN genómico de plantas foi demonstrado por Delseny *et al.* [63]. Posteriormente foi demonstrado que estas sequências eram ubíquas na maioria dos organismos, e representam uma importante fonte de variação genética [30]. Em eucariotas estima-se que existam microssatélites em aproximadamente 10^4 - 10^5 loci, dispersos aleatoriamente no genoma. Esta abundância de microssatélites constitui uma fonte quase ilimitada de locais polimórficos que podem ser explorados como marcadores genéticos. A maioria dos microssatélites estudados (48-67%) são dinucleótidos. Em animais, a mais frequente é AC, em plantas, as repetições dinucleotídicas que ocorrem com mais frequência correspondem às repetições do tipo AT [64].

Os polimorfismos associados num locus específico devem-se á variação do comprimento do microssatélite, que por sua vez depende do número de repetições dos nucleótidos. As variações no número de unidades repetitivas deve-se principalmente ao deslizamento da enzima ADN polimerase durante a replicação de ADN [62, 65].

Estes marcadores moleculares são codominantes, abundantes no genoma e apresentam um elevado grau de diversidade alélica. Além disso a interpretação dos resultados demonstrou ser bastante fácil [30]. A deteção do tamanho dos microssatélites tem sido feita utilizando sistemas de capilares em sequenciadores automáticos, o que está associado a uma boa resolução, elevada sensibilidade e reprodutibilidade [30].

Os microssatélites, por serem altamente polimórficos, são marcadores genéticos muito potentes e com uma grande capacidade para resolver diferenças genéticas quando comparados a outras classes de marcadores genéticos. Por estas razões estes marcadores são rotineiramente utilizados para identificação forense, determinação de relações genéticas entre indivíduos, estudos filogenéticos e genéticos em populações [65-67].

O grande poder discriminatório dos microssatélites justifica o seu uso quando se pretende obter uma boa representação da diversidade genética numa população. O conhecimento da quantidade e da distribuição da variabilidade genética é importante para o desenvolvimento de estratégias de preservação de castas [30].

Vários microssatélites foram isolados e caracterizados em diversas espécies das plantas frutíferas, tais como o *Prunus persica* (pêssego) [68], a *Malus domestica* (maçã) [69] e a *Vitis vinifera* (videira) [70, 71].

- **Marcadores Microssatélites em Videira (*Vitis spp.*)**

Thomas e Scott [72] foram os primeiros investigadores a utilizar os microssatélites para identificar as diferentes castas de videira. Estes autores mostraram que os microssatélites eram abundantes e continham polimorfismos genéticos capaz de caraterizar e identificar as variedades de *Vitis vinifera* e conseguiram identificar 26 castas de *V. vinifera* e 6 espécies de *Vitis* [72]. Eles também demonstraram através de análises filogenéticas que os microssatélites são codominantes e comportam-se de acordo com a herança mendeliana simples, confirmando a sua utilização para o mapeamento genético. Posteriormente, o estudo foi alargado para mais de 80 genótipos que incluíam uvas de vinho, uvas de mesa, uvas para a produção de passas e porta-enxertos [30]. Posteriormente,

outros grupos iniciaram pesquisas com microssatélites, resultando no desenvolvimento de *primers* específicos para *Vitis* [73-79].

O elevado poder de discriminação que se obtém com estes marcadores moleculares pode ser utilizado para determinar a identidade de uma casta e identificar material vegetal de origem desconhecida ao comparar o genótipo obtido com genótipos de referências, que estão armazenadas numa base de dados [30].

Atualmente, a identificação de castas tem sido obtida através de microssatélites. Em Portugal, diferentes estudos demonstraram a aplicabilidade com sucesso destes marcadores na identificação de castas portuguesas. Almadanim *et al.* [80] conseguiram distinguir 51 castas portuguesas importantes na produção de vinho analisando 6 loci de microssatélites. Castro *et al.* [4] conseguiram identificar todas as castas utilizadas na produção de Vinho Verde analisando 12 loci de microssatélites. Veloso *et al.* [13] genotiparam as 313 castas oficialmente autorizadas na produção de vinho em Portugal usando 6 loci de microssatélites. Os autores concluíram que estes loci eram muito informativos, tendo permitido discriminar as castas estudadas. Assim, o estudo possibilitou a identificação de 244 genótipos distintos e a identificação de sinónimos em 40 castas.

Apesar de os microssatélites serem apropriados na identificação de castas, considerando o baixo nível de diversidade entre clones, estes marcadores moleculares não são definitivamente adequados para identificação clonal como foi mencionado por Imazio *et al.* [81] e por Cipriani *et al.* [82].

O potencial dos microssatélites não se centra apenas em estudos de genotipagem [54, 83-87]. Nos últimos anos, os microssatélites têm sido aplicados na videira em estudos de *pedigree* [88-92], identificação de QTLs (*quantitative trait locus*) [93-97], mapeamento genético e físico [98-105] e na identificação de sinónimos e homónimos [106-112].

A análise de microssatélites pode favorecer a confirmação e definição de sinónimos, ou seja, podem identificar genótipos idênticos conhecidos sob diferentes nomes [30]. A identificação de duplicados é de importância particular em coleções de germoplasma, onde deve ser mantida uma variabilidade genética máxima, mantendo o número de espécies no mínimo [30]. Vários sinónimos foram detetados na Colecção Ampelográfica Nacional de Portugal por Lopes *et al.* [113]. Os autores demonstraram que as castas dentro dos seguintes grupos, Fernão Pires/Maria Gomes, Boal Cachudo/Boal da Madeira/Malvasia Fina, Sória/Crato Branco/Roupeiro, Periquita/Castelão Francês/João de

Santarém/Trincadeira e Verdelho da Madeira/Verdelho dos Açores/Verdelho roxo tinham perfis de microssatélites idênticos, sendo por isso considerados sinónimos.

Concluindo, a distinção de castas pode ser alcançado em diferentes graus com todos os sistemas de marcadores moleculares mencionados anteriormente. No entanto, até agora, não foi possível detetar polimorfismos entre os diferentes clones de uma determinada casta com qualquer um destes marcadores, à exceção do marcador AFLP. Os primeiros resultados positivos foram descritos por Cervera *et al.* [114]. Depois deste estudo, surgiram outros estudos onde se mostra a aplicabilidade deste marcador na identificação de clones da mesma casta na videira [115, 116]. Contudo, como já foi referido anteriormente, a principal desvantagem dos AFLPs é a sua incapacidade de distinção entre indivíduos homozigóticos dos indivíduos heterozigóticos [33].

- ***Single Nucleotide Polymorphism (SNP)***

Os *Single Nucleotide Polymorphism* têm emergido como uma importante ferramenta no campo da genética e a sua utilização tem vindo a aumentar como marcadores moleculares em vários laboratórios para diversas aplicações. Eles possuem características únicas que os tornam favoritos em relação aos outros marcadores referidos anteriormente. O custo inicial envolvido é bastante elevado para estes marcadores. Contudo, eles são passíveis de automação, e assim, eventualmente, podem tornar-se rentáveis [32].

Um SNP, tal como o nome indica, é um polimorfismo que ocorre apenas numa base individual, ou seja, é uma variação nas sequências do ADN que ocorre numa posição individual e difere no genoma entre membros da mesma espécie ou entre pares de cromossomas de um indivíduo, com frequência de pelo menos 1%. Os SNPs também englobam inserções e deleções (INDEL), desde que ocorra com uma frequência de pelo menos 1% [32, 117]. A figura 1 exemplifica um SNP.

Indivíduo 1	TCGACT A CTCTA
Indivíduo 2	TCGACT G CTCTA
Indivíduo 3	TCGACT R CTCTA
Indivíduo 4	TCGACT R CTCTA
Indivíduo 5	TCGACT A CTCTA
Indivíduo 6	TCGACT A CTCTA
SNP	A/G

Figura 1 – Exemplo de uma mutação pontual (SNP) observado em seis indivíduos. A mutação pontual corresponde a uma transição purina-purina ($A \Leftrightarrow G$) e encontra-se destacada.

Os SNPs num determinado local numa molécula de ADN, teoricamente, envolvem quatro possíveis nucleótidos, mas, na realidade, apenas duas destas quatro possibilidades foram observadas em locais específicos numa população. Assim, os SNPs são em grande parte de natureza bi-alélica [32]. Em consequência desta natureza bi-alélica, o conteúdo informativo de um SNP é limitado, em comparação com os marcadores microssatélites que são polialélicos. Ainda assim, a grande abundância de SNPs em grande parte compensa a desvantagem de sua natureza bi-alélica, tornando-os marcadores moleculares mais atrativos desenvolvidos até agora [32, 118-120].

Os SNPs podem resultar em transições: purina-purina ($A \Leftrightarrow G$) ou pirimidina-pirimidina ($C \Leftrightarrow T$), ou em transversões: purina-pirimidina ou vice-versa ($A \Leftrightarrow C$, $A \Leftrightarrow T$, $G \Leftrightarrow C$, $G \Leftrightarrow T$) [121].

A distribuição de SNPs varia no genoma, sendo menos frequentes em regiões codificadoras que nas não-codificadoras [117]. Os SNPs que residem nas regiões não-codificantes podem ocorrer em sequências intergênicas, nas regiões intrónicas, promotores e *enhancers*. Um SNP intrónico pode afetar o *splicing* alternativo assim como, um SNP no promotor pode influenciar na expressão génica. Os SNPs que ocorrem em regiões codificantes podem ser classificados em dois grupos: sinónimos, os quais não afetam a estrutura primária das proteínas e em não-sinónimos os quais alteram a sequência do produto proteico. Um SNP do tipo sinónimo pode modificar a estrutura e a estabilidade do RNA mensageiro e, consequentemente, afetar a quantidade de proteína produzida, resultando em diferenças fenotípicas. Além disso, os SNPs podem gerar codões de

terminação na molécula de RNA mensageiro e alterar codões de iniciação de tradução [117].

De todos os marcadores moleculares, os SNPs são os mais abundantes e estão amplamente distribuídos por todo o genoma, apesar de a sua ocorrência e distribuição variar entre as espécies [32, 45]. No genoma humano, bem como nos genomas de diversas espécies de plantas, a frequência de SNPs foi demonstrado ser uma ordem de magnitude maior do que os microssatélites [119, 122]. No genoma humano estima-se que existem 1.42 milhões de SNPs, ou seja, 1 SNP por cada 1,9kbp [32, 45, 123]. Em plantas os SNPs ocorrem com mais frequência ao longo do genoma. No genoma do milho 1 SNP de 70bp em 70 bp e 1 SNP de 20bp em 20bp no trigo têm sido observados em algumas regiões [32, 45, 124].

Embora o conteúdo de informação de polimorfismo dos SNPs seja menor do que os microssatélites, dezenas, centenas ou mesmo milhares SNP pode ser facilmente usados quando necessário. Além disso, são marcadores moleculares codominantes; os SNPs têm uma baixa taxa de mutação (mais estáveis), quando comparados com os microssatélites; facilmente são passíveis e são reprodutíveis entre laboratórios [125].

Os SNPs têm um elevadíssimo potencial de utilização nas mais diversas áreas. Em plantas têm sido utilizados para determinação de biodiversidade em *Arabidopsis*, cevada e milho [124, 126-128]. A importância económica da videira também levou à identificação de SNPs a partir de bibliotecas de *expressed sequence tags* (EST) [129, 130] ou através de outros métodos [131-133]. Além disso a sequenciação da variedade heterozigótica Pinot noir pelo grupo de Velasco *et al.* [134] também veio permitir a identificação de SNPs. Myles *et al.* [131] identificaram aproximadamente 49000 SNPs na *V. vinifera*.

Depois de se ter identificado SNPs na videira, estes foram aplicados às mesmas em construção de mapas genéticos [104, 135], identificação de QTLs [103] e na identificação de variedades de videira [136-138]. Recentemente Cabezas *et al.* [138], utilizaram 48 SNPs, para discriminaram castas de *V. vinifera*.

Os cinco tipos de marcadores moleculares referidos anteriormente (RFLP, RAPD, AFLP, SSR e SNP) são os mais utilizados no estudo do genoma de plantas, animais e

humanos. A Tabela 1 compara alguns aspetos dos cinco marcadores moleculares mais utilizados.

Tabela 1 – Análise comparativa entre alguns marcadores moleculares.

	RFLP	RAPD	AFLP	Microssatélites	SNP
Abundância	Elevada	Elevada	Elevada	Média	Muito elevada
Reprodutibilidade	Elevada	Baixa	Elevada	Média	Elevada
Nível de polimorfismo	Médio	Médio	Médio	Elevado	Elevado
Expressão génica	Codominante	Dominante	Dominante	Codominante	Codominante
Requerimento técnico	Elevado	Baixo	Médio	Elevado	Elevado
Custo	Médio	Baixo	Baixo	Elevado	Elevado
Quantidade de ADN requerido	Elevado	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
Principal aplicação	Construção de mapas físicos	Marcação de genes	Marcação de genes	Determinação de variabilidade genética	Construção de mapas genéticos e físicos

Até ao momento ainda não se realizou um estudo usando SNPs para identificar diferentes clones da mesma casta em *Vitis vinifera*. Tendo em conta que a variabilidade que se verificam em clones, devem-se principalmente a mutações pontuais, os SNPs, são potenciais marcadores moleculares para a discriminação de clones de videira. Assim, neste estudo vai-se recorrer aos SNPs como marcadores moleculares para a discriminação de castas e clones de *V. vinifera*.

II. Objetivos

2 Objetivos

A *V. vinifera* caracteriza-se por uma grande variabilidade genética, morfológica e metabólica, o que constitui um problema para a identificação e discriminação de castas e clones de videira. A correta identificação de castas e clones de *V. vinifera* é importante quer para os agentes económicos (viveirista, produtor, adega) quer para o consumidor. Como as variedades de uva têm um efeito direto sobre a qualidade do produto acabado, a seleção e identificação de castas e clones são uma preocupação primordial para a qualidade do vinho.

Assim, o objetivo geral deste trabalho consiste na identificação de castas e clones de *V. vinifera*, sendo que para o atingir definimos os seguintes objetivos específicos:

- i. Identificação e Caracterização de SNPs.
- ii. Avaliar o potencial de SNPs para discriminação de clones de castas de *V. vinifera*.

III. Material e Métodos

3 Material e Métodos

3.1 Recolha de amostras

Recolheram-se amostras de castas Nacionais e Internacionais, provenientes da Estação Vitivinícola Nacional, Instituto Nacional de Investigação Agrária – Dois Portos (INRB, I.P./INIA). Colheram-se, etiquetaram-se e colocaram-se as folhas das plantas, em sacos individuais. No laboratório, armazenaram-se as amostras -80°C.

3.2 Extração de ADN genómico de videira

O protocolo aplicado para a extração de ADN a partir de folhas de videira foi adaptado do protocolo do DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) com introdução de alguns procedimentos. Adicionou-se 0,100 mg de folha de videira e 200 µL de esferas de vidro (~0,5 mm de diâmetro) num *eppendorf* de 2mL. A disrupção celular foi feita em dois ciclos de 3 minutos num TissueLyser a 30 Hz. Depois disto, adicionou-se 400µL de tampão AP1, 40µL de PVP 10% e 4µL de RNase A. Levou-se ao vortex todos os *eppendorfs* preparados anteriormente e incubou-se durante 10 minutos a 65°C. De seguida, adicionou-se 130µL de tampão AP2, misturou-se e colocou-se em gelo durante 5 minutos. Depois, pipetou-se o lisado para uma coluna “QIAshredder Mini spin” colocada num tubo coletor de 2 mL e centrifugou-se a 20000g durante 2 minutos. De seguida, transferiu-se o sobrenadante para um tubo de *eppendorf*. Adicionou-se 1.5 volumes do tampão AP3/E ao sobrenadante e ressuspendeu-se. Seguidamente, transferiu-se 650µL da mistura anterior para coluna “DNeasy Mini spin” e centrifugou-se a 6200g durante 1 minuto e no fim descartou-se o sobrenadante. Repetiu-se o passo anterior para o resto da amostra. Depois, colocou-se a coluna num novo tubo coletor de 2mL e adicionou-se 500µL de tampão AW e centrifugou-se a 6200g durante 1 minuto e no fim descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se novamente 500µL de tampão AW e centrifugou-se a 20000g durante 2 minutos. Por fim, colocou-se a coluna num *eppendorf* de 1,5mL e adicionou-se 75µL de tampão AE para eluir o ADN. Incubou-se durante 5-10 minutos a temperatura ambiente e depois centrifugou-se a 6200g durante 1 minuto.

3.3 Quantificação do ADN

A quantidade e a pureza das amostras de ADN foram determinadas pela leitura da densidade ótica a 260nm e 280nm num espectrofotómetro NanoDrop ® ND-1000 UV-Vis (ThermoScientific), de acordo com as especificações do fabricante.

3.4 SNPs

3.4.1 Seleção de SNPs

Com o intuito de avaliar o potencial de SNPs para a discriminação de clones e castas de *V. vinifera*, pesquisaram-se na bibliografia SNPs em videiras. Depois disto, avaliou-se a sua conservação e deste modo selecionaram-se os SNPs menos conservados, e que por conseguinte apresentariam uma maior probabilidade de conseguirem distinguir castas e clones de videira. Para tal, fez-se um BLAST do SNP contra outras espécies de plantas como a *Arabidopsis thaliana*. Depois deste passo, seguiu-se para o desenho de *primers*.

3.4.2 Desenho dos *primers*

Desenharam-se *primers* (*forward* e *reverse*) de modo a amplificar os fragmentos que contêm os SNPs. O programa utilizado para a construção dos *primers* foi o Oligo Explorer, versão 1.2.

O desenho dos *primers* teve em conta vários critérios: (i) tamanho dos *primers* entre 18 a 23 nucleótidos, (ii) temperatura de *melting* (T_m) entre 58-60°C, (iii) percentagem de GC entre 40-70%, (iv) diferença até 2°C na T_m entre o *primer forward* e *reverse*, (v) tamanho mínimo do amplicão: 100bp, (vi) tamanho máximo do amplicão: 280bp.

Depois de introduzidos estes critérios, o *software* gerou uma lista com vários pares de *primers*. Destes, e sempre que possível, foram escolhidos os pares de *primers* que não formavam estruturas secundárias. A formação de estruturas secundárias dos *primers*, produzidas por interações inter e intramoleculares podem levar a uma fraca formação de produto de PCR.

Os *primers* foram encomendados à Invitrogen, à Sigma e à IDT. Depois de encomendadas, ressuspenderam-se em tampão TE 1x a uma concentração final de 100 µM,

sendo os mesmos diluídos a uma concentração final de 10 μ M para serem utilizados nas reações de PCR.

3.4.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As reações para a amplificação dos fragmentos que contêm os SNPs foram realizadas no termociclador da Eppendorf (Eppendorf MasterCycler Gradient nº5341). Fez-se a reação de PCR para cada amostra de ADN e para cada par de *primer*. Para cada par de *primer* foi preparada uma mistura para um volume final de 25 μ l, contendo 1x PCR Buffer (Bioron); 1,7mM de $MgCl_2$; 0,2mM de dNTPs (Bioron); 0,4 μ M de cada *primer*; 1U de *Taq* Polimerase (Bioron) e 10-40ng de ADN. Todas as reações foram acompanhadas de um controle negativo, formado por todos os compostos da reação, com exceção do ADN genómico, cujo volume foi substituído por água Milli-Q estéril.

Foi utilizado o seguinte programa de PCR: um período inicial de desnaturação de 2 minutos a 94°C, seguido de um ciclo de 30 repetições de 30 segundos a 94°C, 30 segundos à temperatura de *annealing* do respetivo *primer*, 60 segundos a 72°C, e finalmente um período de extensão de 5 minutos a 72°C. Os produtos de amplificação foram conservados a 4°C até à sua resolução segundo a metodologia descrita em 3.4.4.

3.4.4 Eletroforese dos produtos de amplificação

A confirmação da reação de amplificação foi realizada no LabChip® 90. Este equipamento, permite fazer a separação dos ácidos nucleicos (eletroforese capilar), de forma rápida precisa e automatizada. O protocolo utilizado foi de acordo com as especificações do fabricante.

Para além desta metodologia, a confirmação da reação de amplificação, efetuou-se por eletroforese horizontal em géis de agarose. Prepararam-se géis de agarose a 1% (p/v) em TAE 1x, que foram corados com brometo de etídio numa concentração final de 0,3 μ g/mL. Por cada amostra, retirou-se 8 μ L do produto de reação de PCR e adicionou-se 2 μ L de tampão de deposição. Para verificar a amplificação com o tamanho pretendido, comparou-se o produto com um marcador molecular NZYDNA Ladder I (NZYTech). A eletroforese decorreu a 90V durante 30 minutos. Após a corrida de PCR, visualizaram-se os géis sob luz ultravioleta no Molecular Imager Gel Doc XR System (BioRad). As imagens geradas, foram adquiridas e analisadas através do programa Quantity One versão 4.6.3 (BioRad). As composições das soluções utilizadas encontram-se no Anexo I.

3.4.5 Purificação dos fragmentos amplificados

Após a amplificação, e antes de se proceder à reação de sequenciação, torna-se necessária a remoção dos reagentes em excesso resultantes da amplificação por PCR, como *primers* e dNTPs.

A purificação foi realizada recorrendo ao Kit Ilustra Exostar (GE Healthcare). Este kit de purificação, é formado por duas enzimas hidrolíticas – Exonuclease I e a Fosfatase Alcalina. A enzima exonuclease I degrada o ADN *single strand*, como os *primers*, no sentido 3'-5', libertando os desoxirribonucleotídeos monofosfatados. Já a função da enzima Fosfatase Alcalina, é a de desfosforilar os dNTPs que não foram incorporados na reação de PCR e desfosforilar os dNMPs.

Adicionou-se 0,7µL de cada enzima a 3,5 µL do produto de PCR em novos tubos de PCR de 0,2mL, posteriormente, colocaram-se os tubos no termociclador da Eppendorf (Eppendorf MasterCycler Gradient nº5341) a 37°C durante 15 minutos e de seguida, a 80°C durante 15 minutos. A seguir, procedeu-se à reação de sequenciação.

3.4.6 Genotipagem de SNPs

Os fragmentos anteriormente amplificados, foram sequenciados a fim de identificar SNPs. As reações de sequenciação foram baseadas na técnica de sequenciação por terminação de cadeia por didesoxinucleotídeos descrita por Sanger *et al.* [139]. Para tal, foi empregado o Big[®]Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems) para as reações de sequenciação. Fez-se a reação de sequenciação para cada amostra de ADN e para o *primer forward* dos *primers* pares utilizados. Para cada *primer* foi preparada uma mistura para um volume final de 10µl, contendo 2µL de BigDye[®] Terminator v3.1 Sequencing Buffer (5x), 2µL de BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction-100, 3,2pmol dos oligonucleotídeos *forward*, 4,9 µL do produto de PCR purificado e 0,6µL de H₂O Milli-Q estéril. As reações de sequenciação ocorreram no termociclador da Eppendorf (Eppendorf MasterCycler Gradient nº5341), utilizando o seguinte programa: um período inicial de desnaturação de 3 minutos a 96°C, seguido de um ciclo de 25 repetições de 10 segundos a 96°C, 5 segundos à temperatura de *annealing* do respetivo *primer*, e 4 minutos a 60°C.

Após a reação de sequenciação realizou-se a purificação dos seus produtos através do BigDye® XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems). Adicionou-se a cada poço da placa de sequenciação 45µL da solução SAM™, 10µL da solução XTerminator™ e 10uL do produto de PCR. Selou-se a placa de sequenciação e agitou-se no vortex IKA® MS 3 Basic durante 30 minutos a 2000rpm. No fim centrifugou-se a placa durante 2 minutos a 1000g.

Por fim, as amostras foram corridas num sequenciador automático Genetic Analyser 3500 (Applied Biosystems) para a realização da eletroforese capilar.

3.4.7 Análise dos dados

A detecção de polimorfismos envolve o conhecimento da sequência de ADN para um mesmo loci de vários indivíduos dentro de uma determinada população, permitindo a observação de posições específicas que possam apresentar variações as quais caracterizam os diferentes alelos. Desta forma, as sequências obtidas foram analisadas com o auxílio do *software* Codon Code Aligner versão 3.7.1. A qualidade das sequências obtidas foram verificadas através do eletroferograma. Depois de verificada a qualidade, as sequências geradas foram alinhadas através do Clustal W para a detecção de SNPs.

3.4.8 Construção das árvores filogenéticas

Para a construção das árvores filogenéticas, recorreu-se à plataforma Phylogeny.fr disponível na internet [140]. A análise foi feita no modo “Advanced” e todos os parâmetros estavam no modo “default”. A única alteração realizada foi modificar de “Approximate Likelihood-Ratio Test” para o procedimento de “bootstraping”, com um número de bootstraps igual a 500.

3.5 Microssatélites

3.5.1 Seleção e teste de *Primers*

Selecionaram-se um total de 14 loci de microssatélites, provenientes de pesquisa bibliográfica e cruzamento de dados entre a OIV (International Organisation of Vin and Wine), a Base de Dados Europeia da *Vitis* (The European *Vitis* Database) e um estudo de Laucou *et al.* [141].

Tabela 2 – Nomes, sequência de *primers*, tamanho e repetição dos microssatélites utilizados na identificação de castas. Os 14 loci de microssatélites estão divididos em 3 *multiplex*s

Microssatélite	Multiplex	Fluoróforo	Tamanho	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')	Repetição	Referência
VVIh54	1	NED	139-187	CCGCACTTGTGTTGAATTTTCAG	CAAACCGTTTTTACACCAGCAG	(GA) _n	Merdinoglu et al. (2005)
VVIq52		FAM	71-89	TAAAAGGATGGTAGATGACAGA	TAAAAGGATGGTAGATGACAGA	(CT) _n	Merdinoglu et al. (2005)
VVMD5		VIC	216-287	CTAGAGCTACGCCAATCCAA	TATACCAAAAATCATATTCCTAAA	(CT) _n AT(CT) _n ATAG(AT) _n	Bowers et al. (1999)
VVMD7		FAM	231-268	AGAGTTGCGGAGAACAGGAT	CGAACCTTCACACGCTTGAT	(CT) _n	Bowers et al. (1999)
VrZAG79		PET	236-260	AGATTGTGGAGGAGGGAACAACCG	TGCCCCCATTTTCAAACCTCCCTCC	(GA) _n	Sefc et al. (1999)
VVS2	2	FAM	120-165	CAGCCCGTAAATGTATCCATC	AAATTCAAAATTCTAATTCAACTGG	(GA) _n	Thomas and Scott (1993)
VrZAG62		NED	185-203	GGTGAAATGGGCACCGAACACACGC	CCATGTCTCTCCTCAGCTTCTCAGC	(GA) _n	Sefc et al. (1999)
VVMD27		VIC	172-218	GTACCAGATCTGAATACATCCGTAAGT	ACGGGTATAGAGCAAACGGTGT	(CT) _n	Bowers et al. (1999)
VVMD32		PET	217-289	TATGATTTTTTAGGGGGGTGAGG	GGAAAGATGGGATGACTCGC	(CT) _n	Bowers et al. (1999)
VVIb01		VIC	278-318	TGACCCTCGACCTTAAATCTT	TGGTGAGTGCAATGATAGTAGA	(CT) _n	Merdinoglu et al. (2005)
VVMD25		FAM	234-272	TTCCGTTAAAGCAAAAGAAAAAGG	TTGGATTGAAATTATTGAGGGG	(CT) _n	Bowers et al. (1999)
VVMD28	3	FAM	214-282	AACAATTCAATGAAAAGAGAGAGAGA	TCATCAATTCGTATCTCTATTGCTG	(CT) _n	Bowers et al. (1999)
VVIp60		VIC	291-348	GGGGAATACTAAATTGAGGAT	GTATGAATGCGGATAGTTTGTG	(TG) _n AT(GT) _n (GA) _n	Merdinoglu et al. (2005)
VVin16		NED	141-175	ACCTCTATAAGATCCTAACCTG	AAGGGAGTGTGACTGATATTC	(CA) _n CG (CA) _n	Merdinoglu et al. (2005)

Os *primers* foram encomendados e marcados com fluoróforos (*Primer forward*): VVIh54, VrZAG62 e VVin16 com o fluoróforo NED (amarelo); VVIq52, VVMD7, VVS2, VVMD25 e VVMD28 com o fluoróforo FAM (azul); VVMD5, VVMD27, VVIb01 e VVIp60 com o fluoróforo VIC (verde) e VrZAG79 e VVMD32 com o fluoróforo PET (vermelho), de forma a serem detetados pelo equipamento de eletroforese capilar. Após a encomenda, ressuspenderam-se em tampão TE 1x a uma concentração final de 10 µM para serem utilizados nas reações de PCR.

3.5.2 *Multiplex*

De forma a garantir uma maior eficiência e rapidez na amplificação de microssatélites, os 14 loci foram divididos em três multiplexes distintos, em função do seu tamanho (número de pares de bases esperado) e fluoróforos utilizados.

3.5.3 PCR em *Multiplex*

Procedeu-se à amplificação dos microssatélites através de reações de PCR em *Multiplex*, seguida de análise de fragmentos (Eletroforese Capilar).

Para a realização da reação em *multiplex* utilizou-se o “Type-it Microsatellite PCR Kit” (Quiagen). Para cada amostra, adicionou-se 6,25 uL de MasterMix de Type-it (2x), 4,75ul de água Milli-Q estéril, 1ul de amostra (0,5ng/ul) e 0,5ul de uma mistura de *primers*, de acordo com o *multiplex* em causa.

A mistura de *primers* foi preparada a partir de soluções *stock* de cada *primer*, a concentrações de 10ng/ul. Assim, para a reação de PCR em *Multiplex*, os *primers* encontravam-se em concentrações otimizadas, de acordo com a tabela 3.

Fez-se a reação de PCR no termociclador da Eppendorf (Eppendorf MasterCycler Gradient nº5341) e utilizou-se o seguinte programa de PCR: um período inicial de desnaturação de 5 minutos a 96°C, seguido de um ciclo de 28 repetições de 30 segundos a 95°C, 90 segundos a 56°C, 30 segundos a 72°C, e finalmente um período de extensão de 30 segundos a 60°C.

Tabela 3 – *Primers* em *multiplex* com as concentrações otimizadas de cada um

	<i>Primer</i>	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
<i>Multiplex1</i>	VVIh54	0.048uM	0.048uM
	VVI152	0.038uM	0.048uM
	VVMD5	0.08uM	0.09uM
	VVMD7	0.048uM	0.048uM
	VrZAG79	0.017uM	0.032uM
<i>Multiplex2</i>	VVS2	0.048uM	0.048uM
	VrZAG62	0.032uM	0.032uM
	VVMD27	0.048uM	0.048uM
	VVMD32	0.032uM	0.032uM
	VVIb01	0.032uM	0.032uM
	VVMD25	0.032uM	0.032uM
<i>Multiplex3</i>	VVMD28	0.048uM	0.048uM
	VVIp60	0.048uM	0.048uM
	VVIIn16	0.048uM	0.048uM

3.5.4 Análise de Fragmentos

Após a amplificação dos microssatélites, procedeu-se então à análise de fragmentos através do equipamento 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Para cada reação, de PCR retirou-se 1ul das amostras aos quais adicionou-se 8,75ul de formamida e 0,25ul de Liz (GeneScan_500_Liz) e após uma breve desnaturação (3 minutos a 60 °C), foi efetuada uma eletroforese capilar levada a cabo pelo sequenciador 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Posteriormente foi realizada a análise de tamanhos e intensidades dos alelos obtidos através do *software* GeneMapper versão 4.1.1 (Applied Biosystems).

3.5.5 Construção das árvores filogenéticas

Para a construção da árvore filogenética, através dos dados obtidos a partir dos microssatélites, recorreu-se ao *software* BioNumerics versão 6.5 (Applied Maths). As distâncias genéticas foram estimadas através da correlação de Pearson e utilizou-se o método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) com o número de *bootstrap* de 1000 para a construção da árvore filogenética.

IV. Resultados e Discussão

4 Resultados e Discussão

4.1 Introdução

A *V. vinifera* caracteriza-se por uma grande variabilidade genética, morfológica e metabólica. Esta elevada variabilidade constitui um problema para a identificação e discriminação de castas e clones de videira. A correta identificação de castas e clones de *V. vinifera* é importante quer para os agentes económicos do sector vitivinícola (viveirista, produtor, adega) quer para o consumidor sendo que as mais recentes regulamentações do comércio internacional e as leis de rotulagem de vinho exigem que os vinhos sejam rotulados com a(s) casta(s) utilizada(s) para a produção de determinado vinho. As variedades de uva têm um efeito direto sobre a qualidade do produto acabado. Assim, a seleção e identificação de castas e clones são uma preocupação primordial para a qualidade do vinho.

No sentido de discriminar castas e clones de *V. vinifera*, neste trabalho, recorreu-se ao uso de SNPs como marcadores moleculares. A escolha incidiu nos SNPs dado às suas características únicas, tais como, serem os marcadores mais abundantes e mais estáveis no genoma. Os SNPs podem ser usados para diversas aplicações, incluindo identificação de castas, a construção de mapas genéticos, estudos de associação entre um dado genótipo e uma característica de interesse, entre outros.

4.2 Seleção e otimização de regiões polimórficas de *V. vinifera*

Com o intuito de discriminar castas e clones de *V. vinifera*, recorrendo aos SNPs, começou-se por pesquisar SNPs na *V. vinifera*. Depois deste passo, avaliou-se a conservação do SNP, recorrendo a ferramentas bioinformáticas. Para tal, fez-se um BLAST do SNP contra outras espécies de plantas. Com este passo pretendeu-se avaliar a sua conservação e deste modo selecionaram-se os SNPs menos conservados, e que por conseguinte apresentariam uma maior probabilidade de conseguirem distinguir castas e clones de videira. Ou seja, um SNP era excluído se este fosse conservado entre várias espécies de plantas uma vez que está associado a um baixo poder discriminatório. Por outro lado, um SNP era selecionado se este fosse exclusivo da videira. Após esta avaliação do SNP, foram selecionados 32 SNPs para utilizar neste trabalho.

Uma vez selecionados, os SNPs, prosseguiu-se para a sua caracterização *in silico*. Pretendeu-se assim saber em que cromossoma e em que região do gene se localiza o SNP bem como o polimorfismo a que está associado. A tabela 4 resume estas características referidas dos 32 SNPs. Importa referir destes 32 SNPs em estudo, 57% localizam-se em intrões; 28% em exões e 15% em regiões intergénicas (Fig. 2).

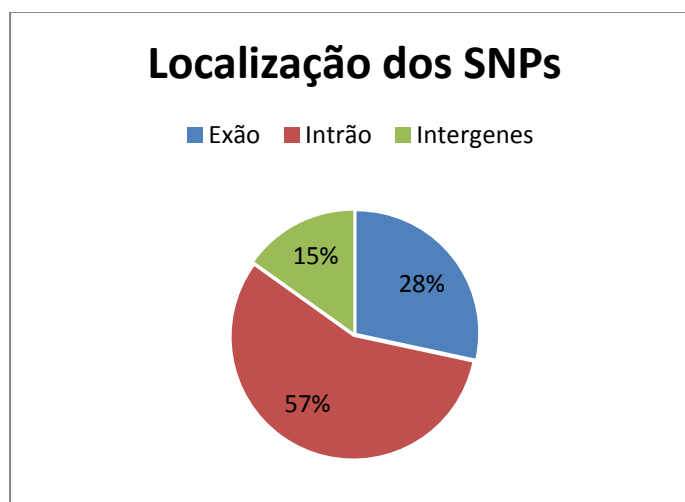


Figura 2 – Localização dos SNPs em estudo

Tabela 4 – Caraterização dos SNPs utilizados no estudo

Nome	Polimorfismo	Localização do SNP	Cromossoma
SNP1	A/G	exão	4
SNP2	C/T	exão	9
SNP3	A/G	intergenes	19
SNP4	A/T	exão	2
SNP5	A/T	intrão	9
SNP6	A/G	intrão	18
SNP7	A/C	intrão	12
SNP8	A/T	intergenes	17
SNP9	A/G	intergenes	10
SNP10	C/T	exão	19
SNP11	C/T	intrão	3
SNP12	C/T	exão	6
SNP13	A/T	intrão	7
SNP14	C/G	exão	8
SNP15	C/T	intrão	D
SNP16	A/G	exão	5
SNP17	C/G	intrão	15
SNP18	C/T	intrão	16

SNP19	A/C	intrão	18
SNP20	A/C	intrão	8
SNP21	A/G	intrão	8
SNP22	G/T	intergenes	10
SNP23	C/T	intrão	8
SNP24	A/G	intrão	3
SNP25	C/T	intrão	3
SNP26	C/T	intrão	6
SNP27	G/T	intrão	6
SNP28	A/T	intrão	14
SNP29	G/T	intergenes	1
SNP30	C/T	intrão	1
SNP31	C/T	exão	11
SNP32	A/C	exão	2

Legenda : D-(cromossoma desconhecido)

Posteriormente, desenharam-se *primers* (*forward e reverse*) de modo a amplificar os fragmentos que contêm os SNPs. Foram desenhados no total 64 *primers* (32 pares de *primers*) para a amplificação dos 32 fragmentos que contêm os SNPs. Para o desenho dos *primers* foi utilizado sequência da videira como molde. Na tabela 5 encontra-se as sequências dos *primers* desenhados.

Tabela 5 – Lista de *primers* utilizados para amplificar os fragmentos que contêm os SNPs. Na tabela está representada o nome do *primer* (F – *Forward*; R – *Reverse*), a sequência, a temperatura de *annealing* e o tamanho do amplicão

Nome	Sequencia 5'-3'	Ta °C	Tamanho do amplicão (bp)
SNP1_F	CCTGCTATCTTATGCGTCTC	54	215
SNP1_R	TCTTCGCCTCCATATTGATAC		
SNP2_F	CTGAGGATAACATCGCGGT	54	238
SNP2_R	GGGGAGGGAAGATGCCAC		
SNP3_F	TCTAACTGCATCGCTCACC	54	269
SNP3_R	TCCTGCTCTACTTCTCCATC		
SNP4_F	CCACAGCAGTCGACACTG	54	234
SNP4_R	CTCACTCCTTACCTCTCTG		
SNP5_F	GCCGTCAGTACTCGTGAC	54	163
SNP5_R	AGACACAGACACAACAATCG		
SNP6_F	TGTCTCTAATCCTCGAGGTC	56	238
SNP6_R	TCTATCTTGCTCTTCTTCACG		
SNP7_F	CACAGTCAACTGCGCTCC	54	258
SNP7_R	CAACTACTCTCTAATCAGCC		
SNP8_F	GCTGTTTCCAGTATCTTTGTC	56	241
SNP8_R	CTTGTCGTTCCGCGTCTTG		
SNP9_F	CCTACCCTCACCATGCTC	54	195
SNP9_R	CGACACCTATCTCTCATCAC		
SNP10_F	TTGTCTCGAGCTTCATCTAC	54	264
SNP10_R	GCCATCACATTCCACTCAC		
SNP11_F	GGTGTGTTGATTGTAGGATC	56	244
SNP11_R	TGATCATTGGTTGTCTGTGAG		
SNP12_F	TGCCTGTTTTAGTGTTTCGTC	54	197
SNP12_R	GTTGTTGGTAGCGATCTGTG		
SNP13_F	GTGTTTAGTGCTTGAGATGAG	54	207
SNP13_R	ATCATGGGAGTGAATGAGAG		
SNP14_F	TACAAAGGAAGGAAGCTACAC	56	193
SNP14_R	CATGTGTGCAAGTCGAGATC		
SNP15_F	GTGGATGTGAATGGAGTGAG	54	146
SNP15_R	ATTGTGGTGAAACAAGGAGC		
SNP16_F	AGACACTGGCAATAGCACAC	56	236
SNP16_R	GGACAGATGAAGGATAAGAGA		
SNP17_F	GGTGTGTGGGATGGGAATG	54	240
SNP17_R	AGGAGCGTTCGGACTATAAT		
SNP18_F	AATGCACTTAAGGCAGTCAAG	56	238
SNP18_R	TGTACTGTGACAATCACAGCA		

Tabela 5 – Continuação

Nome	Sequencia 5'-3'	Ta °C	Tamanho do amplificação (bp)
SNP19_F	CTACAGTTATGGCTCGGTTG	56	233
SNP19_R	GATGGCTTGAACCTACAATGG		
SNP20_F	GAGATGAGAGTGGACAGAG	54	171
SNP20_R	GCTTATGAGAAGGGAGATTAG		
SNP21_F	ACAGCATCGACCTTTAATTCC	56	277
SNP21_R	CGAGAGACGACTATGTGTAG		
SNP22_F	CCAAGGCAGGGTTCATTAG	54	242
SNP22_R	GATTTCAAAAGGGTGTTCAGG		
SNP23_F	AGTCGATGCATATCGTAAGG	54	211
SNP23_R	GTAGAGGTAGACTGTGGAG		
SNP24_F	TTGATGTGAAGGTTAGGATGC	54	243
SNP24_R	GATGGGATGGTAGGCTGG		
SNP25_F	TTCTTCTTGTGTTTGCCCCG	54	184
SNP25_R	CAATACACCCACATCCGTC		
SNP26_F	ACACCTATCGTGTCTGTTCG	54	183
SNP26_R	ACTCCTCATCATGACTTGTC		
SNP27_F	GGCAGAGTGTTGGATCGTG	54	249
SNP27_R	GATGGTGTGAATAGTGTAGG		
SNP28_F	CCTGCTGTCTCACTGACG	54	268
SNP28_R	TCCAATCCGTCTTTCACAAC		
SNP29_F	TCACACTTATCTACCAACCG	54	277
SNP29_R	TTTCCTCTTCCTCTCTTCAC		
SNP30_F	TCTGGATCTGCTGATTCATG	54	247
SNP30_R	CTACTTTTGCTACTCCCTAC		
SNP31_F	GCTGCTGTCTTACGAGTCG	56	205
SNP31_R	TTGAGTGTATCCTGAGCTATG		
SNP32_F	GTTAGAATAAGGTAATTTTCATCC	56	517
SNP32_R	GGATGAGTATAATGGATGGATT		

Os 32 pares de *primers* foram testados para verificar a sua capacidade de amplificação no genoma de videira. Como se pode observar nas figuras 3 e 4, trinta pares de *primers* amplificaram com sucesso o ADN de videira. Para estes pares de *primers*, verifica-se a presença de uma banda, com o tamanho esperado, comprovando a especificidade dos *primers* para a região alvo. Para os pares de *primers* SNP30 e SNP32 obteve-se uma fraca amplificação (bandas fracas). Apenas os pares de *primers* SNP12 e SNP19 não amplificaram o ADN de videira.

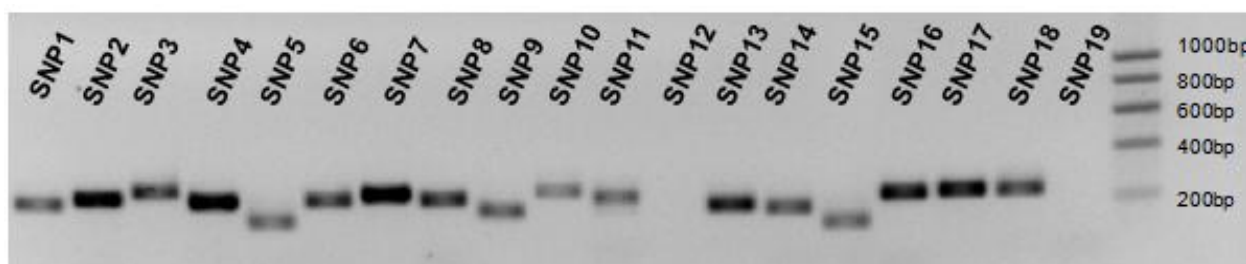


Figura 3 – Teste de amplificação aos *primers* em gel de agarose 1%. Na extremidade está o marcador de peso molecular NZYDNA Ladder I (NZYTech). Para este teste utilizou-se um ADN de videira (Bical-3)

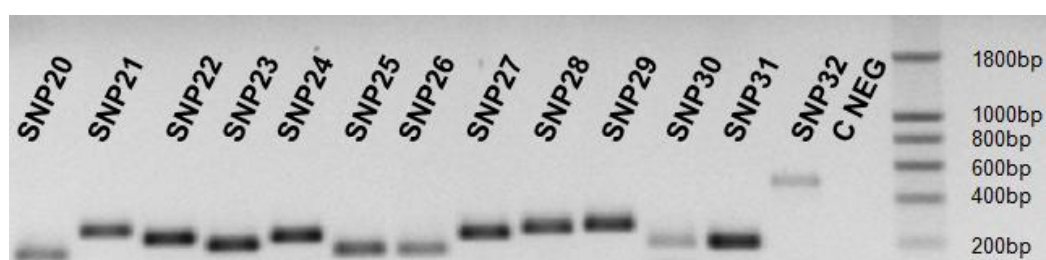


Figura 4 – Teste de amplificação aos *primers* em gel de agarose 1%. Na extremidade está o marcador de peso molecular NZYDNA Ladder I (NZYTech). Para este teste utilizou-se um ADN de videira (Bical-3)

No sentido de aumentar a formação de produtos, procedeu-se à otimização das reações de PCR para os pares de *primers* que não amplificaram e para aqueles que resultaram numa fraca amplificação, aumentando-se a concentração de $MgCl_2$ de 1,7mM para 2,0mM. Os restantes parâmetros da reação de PCR mantiveram-se como está descrito na secção 3.4.3.

Como se pode observar pela figura 5, após a otimização, verificou-se uma amplificação para os pares de *primers* que anteriormente não amplificaram. Verifica-se também que se obteve uma boa amplificação para os pares de *primers* SNP30 e SNP32 pela presença de bandas fortes.

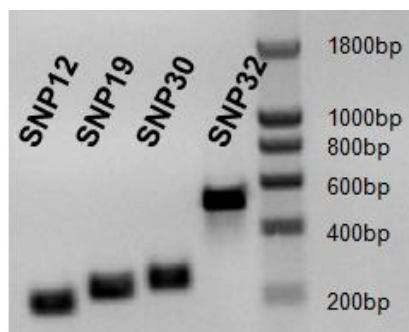


Figura 5 – Otimização dos pares de *primers* SNP12, SNP19, SNP30 e SNP32.

Uma vez otimizadas as reações de amplificação dos 32 SNPs, prosseguiu-se com a genotipagem dos SNPs em várias castas de *V. vinifera*. Foram utilizados 10 castas de *V. vinifera* e para cada casta utilizaram-se 2 clones, à exceção da casta Touriga Nacional, da qual se utilizaram 8 clones. Na tabela 6 estão representadas as castas utilizadas neste estudo. No total foram genotipadas 26 amostras para as 32 regiões selecionadas.

Tabela 6 – Castas utilizadas no estudo.

Nome	Abreviatura	Origem	Tipo de casta
Baga	Baga	Nacional	Tinta
Bical	Bical	Nacional	Branca
Cabernet Sauvignon	C.Sau	Internacional	Tinta
Chardonnay	Chard	Internacional	Branca
Pinot Noir	P.Noir	Internacional	Tinta
Syrah	Syrah	Internacional	Tinta
Tinta Pinheira	T.Pin	Nacional	Tinta
Tinta Roriz	T.Roriz	Nacional	Tinta
Touriga Francesa	T.Fran	Nacional	Tinta
Touriga Nacional	T	Nacional	Tinta

4.3 Genotipagem de *V. vinifera* utilizando SNPs

Para a genotipagem, amplificaram-se, por PCR, as regiões que flanqueavam os SNPs para cada amostra de ADN. O sucesso e a qualidade das amplificações foram confirmados por eletroforese, utilizando através o sistema de eletroforese capilar em chip (LabChip) e/ou através de eletroforese em géis de agarose. Os resultados referentes às amplificações encontram-se no anexo II.

Uma vez amplificados, todas as amostras foram sequenciadas para os 32 fragmentos que contêm os SNPs através do método de Sanger. Após a sequenciação, alinharam-se as sequências das amostras para cada região génica para a deteção de SNPs. Por exemplo, para a região génica SNP24, após o alinhamento das sequências, identificou-se um SNP [C/T] na posição 101 (Figura 6 e 7). Este SNP corresponde àquele que está descrito na literatura [132]. Adicionalmente foi encontrado um SNP [G/T] que não estava descrito na literatura, que se localiza na posição 142 (Figura 7). Constatou-se este facto para 27 das 32 regiões génicas em estudo (84%). O número de SNPs que foram encontrados adicionalmente varia da região em estudo (entre 1 a 9 SNPs foram encontrados, para além do SNP que estava descrito).

Todos os SNPs detetados foram confirmados por análise e comparação dos picos no eletroferograma. O eletroferograma do SNP24 para três indivíduos é apresentado na figura 6.

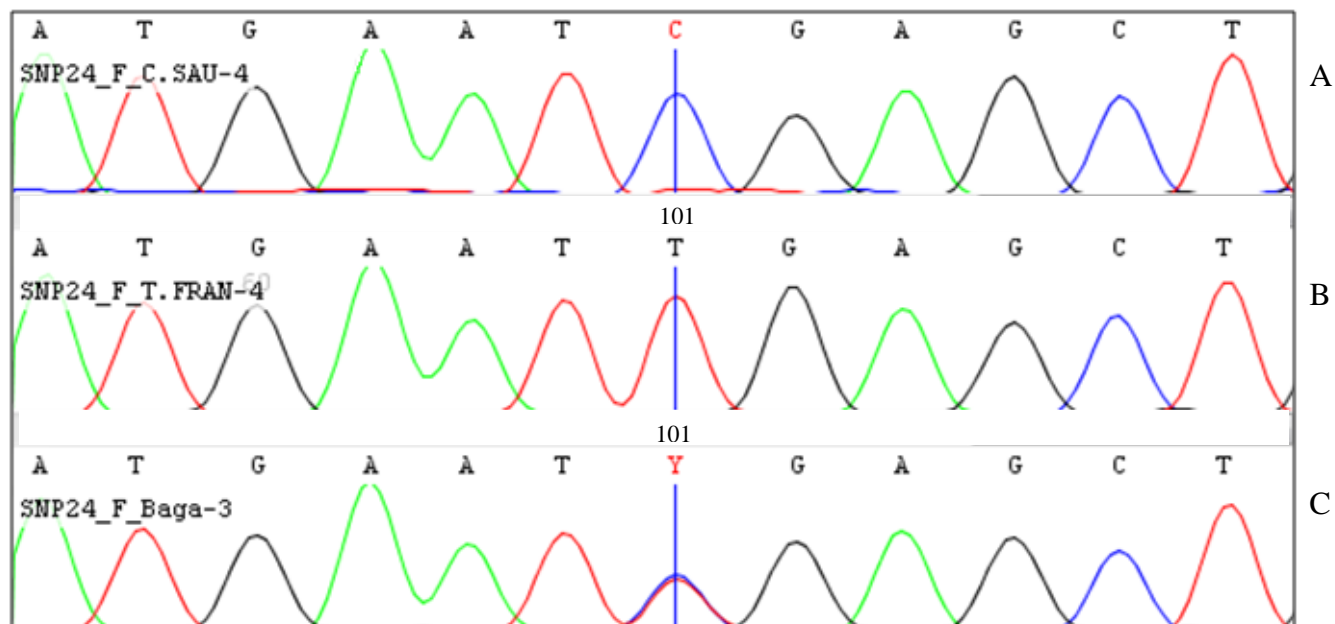


Figura 6 – Exemplo de um eletroferograma obtido por genotipagem do SNP24 de três indivíduos diferentes: A, B e C. O indivíduo A é homozigótico para o alelo C, o indivíduo B é homozigótico para o alelo T e o indivíduo C é heterozigótico

Depois de sequenciadas e analisadas as 32 regiões de todas as amostras, condensaram-se todas as sequências obtidas num único ficheiro fasta (Figura 8). Neste ficheiro cada nucleótido corresponde a um SNP, tendo sido identificados nas 26 amostras, para as 32 regiões um total de 103 SNPs.

SNP24Y.....
SNP24_F_T.PIN-1
SNP24_F_T.PIN-2
SNP24_F_T.FRAN-3
SNP24_F_T.FRAN-4
SNP24_F_C.SAU-4C.....G.....
SNP24_F_C.SAU-5C.....G.....
SNP24_F_Baga-3Y.....
SNP24_F_Baga-5Y.....
SNP24_F_Bical-3
SNP24_F_Bical-5
SNP24_F_Chard-3Y.....
SNP24_F_Chard-5Y.....
SNP24_F_P.Noir-3C.....
SNP24_F_P.Noir-5C.....
SNP24_F_T.Roriz-3
SNP24_F_T.Roriz-6
SNP24_F_Syrah-3
SNP24_F_Syrah-5
SNP24_F_T-16
SNP24_F_T-17
SNP24_F_T-18
SNP24_F_T-19
SNP24_F_T-21
SNP24_F_T-22
SNP24_F_T-23
SNP24_F_T-112
Contigl:	GATTTTGTAAAAATCATACAGATGAATTGAGCTGTGAATTTATATCCCCAGATGTCATTTTCATATGTCCTAATTGTGAGC
	80 90 100 110 120 130 140 150

Figura 7 – Sequências alinhadas para a região SNP24. A primeira sequência corresponde à sequência que está descrita na literatura. Os pontos (.) correspondem a zonas conservadas. Na posição 101 encontra-se o SNP [C/T] e na posição 142 o SNP [G/T].

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
T. Pin-1	GAGTWRATYRYGGCGMTK	TACAGCGGTC	TAYCRYMRSRMTTG	TCTAGYACAYRSWAAYS	SAGGTAGCAYRTTYCSYTYG	TTGSTTTATTCK	TCGCATYTTGATT			
T. Pin-2	GAGTWRATYRYGGCGMTK	TACAGCGGTC	TAYCRYMRSRMTTG	TCTAGYACAYRSWAAYS	SAGGTAGCAYRTTYCSYTYG	TTGSTTTATTCK	TCGCATYTTGATT			
T. Fran-3	GGRTWRWTGTGGYCTGT	TACRGYGGYCTMYCAT	CASRMWYGT	TCYGGCRSAYRSWAAT	CAGGTAGYWTGTTTCCYTYGKKGG	TATGATTKKRYMNTACAGAT				
T. Fran-4	GGRTWRWTGTGGYCTGT	TACRGYGGYCTMYCAT	CASRMWYGT	TCYGGCRSAYRSWAAT	CAGGTAGYWTGTTTCCYTYGKKGG	TATGATTKKRYMNTACAGAT				
C. Sau-4	RGRTWGAWTGTGGCGAYK	TACGGTGGCCTCYCAT	CASRMTYGTCYRRYAS	ATRSTRATNAKRTAK	CAYRCGYCYTYGGKGGYTCAT	GCKTCACACYTYRRTW				
C. Sau-5	RGRTWGAWTGTGGCGAYK	TACGGTGGCCTCYCAT	CASRMTYGTCYRRYAS	ATRSTRATNAKRTAK	CAYRCGYCYTYGGKGGYTCAT	GCKTCACACYTYRRTW				
Baga-3	RGGYWRATTGTGGCGMTK	TACAGCGATCKAYT	ACCAGRMTYGTCYAGCASRYA	STRAYCAKGTMG	CACGYTTTCYYYGKKGG	TTTATTCTTCAYMTYWYRRWT				
Baga-5	RGGYWRATTGTGGCGMTK	TACAGCGATCKAYT	ACCAGRMTYGTCYAGCASRYA	STRAYCAKGTMG	CACGYTTTCYYYGKKGG	TTTATTCTTCAYMTYWYRRWT				
Bical-3	RGGYTRATTACGGCGMTK	TACAKCRRYYTATTACC	AGRMTTCATYAGCAGG	TASWAATCMGGKAG	CACGTTTTYCCCTCGK	TRGTWTRWYTKYRYMTCTTGATT				
Bical-5	RGGYTRATTACGGCGMTK	TACAKCRRYYTATTACC	AGRMTTCATYAGCAGG	TASWAATCMGGKAG	CACGTTTTYCCCTCGK	TRGTWTRWYTKYRYMTCTTGATT				
Chard-3	RGGTTRAWCGTGGCGMTK	TMYAGCGRTCTAYCAY	CRSRMWYGT	TCYRRYASRTASWACT	CMGATAKCATRYTTYCTY	TGTTGGTATGTRWYTKCA	CATCTTGATT			
Chard-5	RGGTTRAWCGTGGCGMTK	TMYAGCGRTCTAYCAY	CRSRMWYGT	TCYRRYASRTASWACT	CMGATAKCATRYTTYCTY	TGTTGGTATGTRWYTKCA	CATCTTGATT			
P. Noir-3	RGRTTRAWTGTGRYGMTK	WMYAGCGRTCTAYCAY	CRSRMWYGT	TCYAGYASRTACARCT	SMGR	TAKYATRCTTYCTYTGKKGG	TWTRWYTGTCRCAYCTTGATT			
P. Noir-6	RGRTTRAWTGTGRYGMTK	WMYAGCGRTCTAYCAY	CRSRMWYGT	TCYAGYASRTACARCT	SMGR	TAKYATRCTTYCTYTGKKGG	TWTRWYTGTCRCAYCTTGATT			
T. Roriz-3	RGRTWRAAYRYRGCSMTK	TAYAGCGATCTAYCAY	CRSRMTYGT	TCYAGTACATRSTRAT	CAGRTMKYAYGTTTCCYTY	GKKGGTATGATTTTCA	CACCTTRATT			
T. Roriz-5	RGRTWRAAYRYRGCSMTK	TAYAGCGATCTAYCAY	CRSRMTYGT	TCYAGTACATRSTRAT	CAGRTMKYAYGTTTCCYTY	GKKGGTATGATTTTCA	CACCTTRATT			
Syarh-3	GGGTTGAATGTGGCSMYG	WMYAGCGRTCTATC	ACCASRMWNTNTCY	GGYACAYNNNNAT	SMGATAKYATR	TTTTYCNNNRGKGG	TATGATTGTCRCATYTYRRTT			
Syarh-5	GGGTTGAATGTGGCSMYG	WMYAGCGRTCTATC	ACCASRMWNTNTCY	GGYACAYNNNNAT	SMGATAKYATR	TTTTYCNNNRGKGG	TATGATTGTCRCATYTYRRTT			
T-16	GGRTTAATYRYGGCSCTG	TACRKCRGYTAC	YAYCAGGA	WTGTCYAGYACAYGG	TAAATCMGR	TAGTATGTTTCCYTYGKKGG	TWYRWKYGTCGCAYYWYRRWT			
T-17	GGRTTAATYRYGGCSCTG	TACRKCRGYTAC	YAYCAGGA	WTGTCYAGYACAYGG	TAAATCMGR	TAGTATGTTTCCYTYGKKGG	TWYRWKYGTCGCAYYWYRRWT			
T-18	GGRTTAATYRYGGCSCTG	TACRKCRGYTAC	YAYCAGGA	WTGTCYAGYACAYGG	TAAATCMGR	TAGTATGTTTCCYTYGKKGG	TWYRWKYGTCGCAYYWYRRWT			
T-19	GGRTTAATYRYGGCSCTG	TACRKCRGYTAC	YAYCAGGA	WTGTCYAGYACAYGG	TAAATCMGR	TAGTATGTTTCCYTYGKKGG	TWYRWKYGTCGCAYYWYRRWT			
T-21	GGRTTAATYRYGGCSCTG	TACRKCRGYTAC	YAYCAGGA	WTGTCYAGYACAYGG	TAAATCMGR	TAGTATGTTTCCYTYGKKGG	TWYRWKYGTCGCAYYWYRRWT			
T-22	GGRTTAATYRYGGCSCTG	TACRKCRGYTAC	YAYCAGGA	WTGTCYAGYACAYGG	TAAATCMGR	TAGTATGTTTCCYTYGKKGG	TWYRWKYGTCGCAYYWYRRWT			
T-23	GGRTTAATYRYGGCSCTG	TACRKCRGYTAC	YAYCAGGA	WTGTCYAGYACAYGG	TAAATCMGR	TAGTATGTTTCCYTYGKKGG	TWYRWKYGTCGCAYYWYRRWT			
T-112	GGRTTAATYRYGGCSCTG	TACRKCRGYTAC	YAYCAGGA	WTGTCYAGYACAYGG	TAAATCMGR	TAGTATGTTTCCYTYGKKGG	TWYRWKYGTCGCAYYWYRRWT			

Figura 8 – Fingerprint obtida após a detecção de todos os SNPs em todas as amostras. R (A/G); W (A/T); S (G/C); K (T/G); M (C/A); N (nucleótido desconhecido).

As sequências geradas foram usadas para investigar as relações entre as castas estudadas. Para tal, recorreu-se à plataforma Phylogeny.fr [140] disponível *online*, onde se procedeu à sua análise filogenética (figura 9).

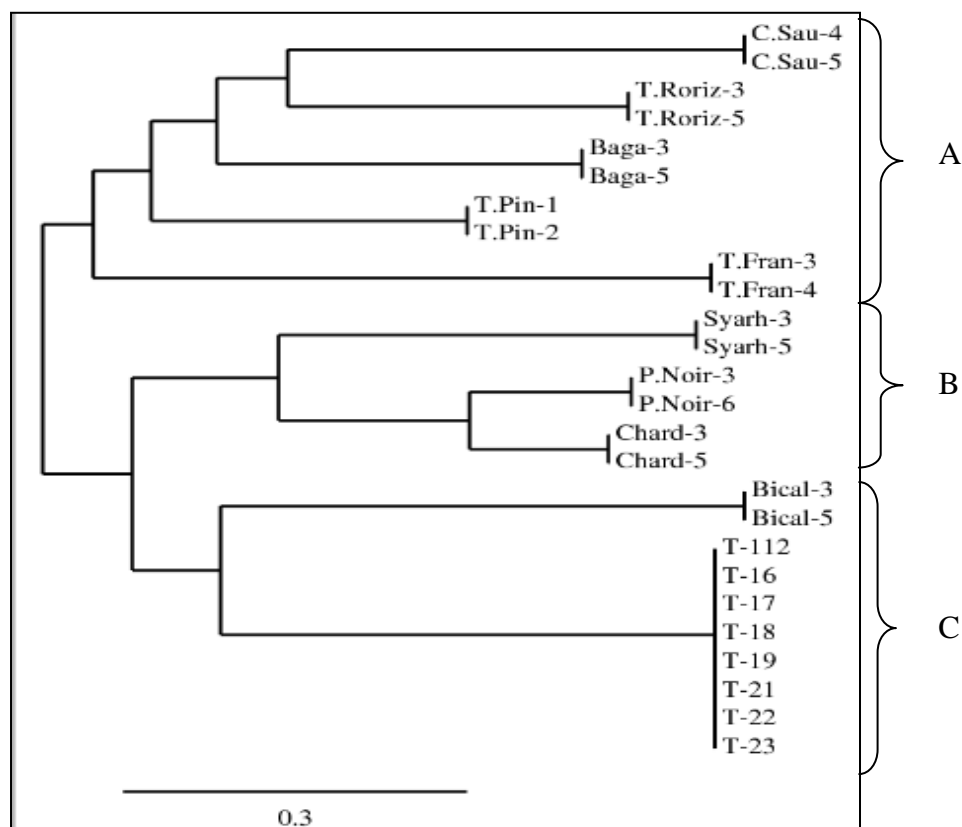


Figura 9 – Dendrograma obtido resultante da análise dos 103 SNP. Análise efetuada com o programa Phylogeny.fr. Número de bootstraps igual a 500.

Utilizando 32 fragmentos, que representam no total 103 SNPs é possível distinguir as 10 castas estudadas neste estudo, como se pode observar pela figura 9, onde é evidente o agrupamento das castas, em diferentes ramos. Em relação aos clones, não foi possível distingui-los com base nos 103 SNPs.

Verifica-se que as 10 castas agrupam em três grandes grupos: A, B e C. No grupo A agrupam as castas Cabernet Sauvignon, Tinta Roriz, Baga e Tinta Pinheiro, no grupo B agrupam as castas Syrah, Pinot Noir e a Chardonnay. No grupo C agrupam as castas Bical e a Touriga Nacional.

No grupo B agrupam as castas de origem internacional. A única casta de origem internacional que não está neste *cluster* é a Cabernet Sauvignon, o que provavelmente se explica pelo facto de esta casta estar presente no território nacional há mais de 100 anos, sendo por isso já considerada uma casta endógena, daí agrupar com as castas de origem nacional (Grupo A). Ainda no grupo B verifica-se que as castas Pinot Noir e a Chardonnay agrupam num subgrupo e a casta Syrah agrupa noutro. Estes resultados vão ao encontro dos trabalhos realizados por Bowers *et al.* [142], Vouillamoz e Grando [143] e por Myles *et al.* [10]. Bowers *et al.* estudaram relações parentais entre 300 castas recorrendo a 32 loci de microssatélites. Com base nos resultados verificaram que a casta Chardonnay resultou do cruzamento das castas Pinot e Gouais. Myles *et al.* também estudaram as relações parentais em várias castas de *V. vinifera*, mas em vez de usarem microssatélites, recorreram a 5387 SNPs. Estes autores também verificaram que a casta Chardonnay é descendente da casta Pinot Noir. Já Vouillamoz e Grando verificaram que a casta Syrah é descendente em 3º grau da casta Pinot. Daí que as castas Pinot Noir e a Chardonnay agrupem num subgrupo, porque estão mais relacionadas do que a casta Syrah.

No que diz respeito às castas de origem nacional, verifica-se que estas agrupam em dois grupos, A e C. Com base nos resultados, as castas Tinta Roriz, Baga e Tinta Pinheiro agrupam no grupo A e as castas Bical e a Touriga Nacional agrupam no grupo C. Ao comparar estes resultados, com os da literatura, verifica-se que não há um consenso. De acordo com Lopes *et al.* [12] das várias castas que estudaram, verificaram que as castas Touriga Nacional, Tinta Pinheira e a Touriga Francesa agrupam num *cluster*. Já as castas Baga, Bical e Tinta Roriz agrupam em outro *cluster*. Os autores usaram 11 loci de microssatélites para discriminar as 46 castas estudadas. Depois de discriminarem as castas, adicionaram mais 17 loci, para além dos 11 anteriormente estudadas para estabelecerem relações entre progenitores e descendentes de castas. Almadanim e colaboradores [80] usaram 6 loci de microssatélites para discriminarem 51 castas e também para estudar as relações entre as castas usadas. Com base nos resultados do estudo de Almadanim e colaboradores [80], as castas Baga, Tinta Pinheira, e Touriga Nacional agrupam no mesmo *cluster*. Por outro lado, as castas Bical e Tinta Roriz agrupam noutro *cluster*.

Assim, os resultados aqui obtidos não estão em linha com o descrito na literatura. Existem vários fatores que poderão explicar esta incongruência entre os dados, tais como

diferentes abordagens metodológicas, e a utilização de diferentes programas para a construção da árvore filogenética.

Resumindo, os 103 SNPs localizados em 32 regiões diferentes foram suficientes para a distinção das 10 castas utilizadas neste estudo. Contudo, pretendeu-se ainda identificar o número mínimo de regiões e de SNPs que permitissem distinguir as 10 castas. Para tal, estudou-se a variabilidade das 32 regiões em separado para verificar se, permitiam discriminar um maior número de castas. Identificou-se assim uma região intergénica, contendo 10 SNPs que permitiu a distinção de 7 castas.

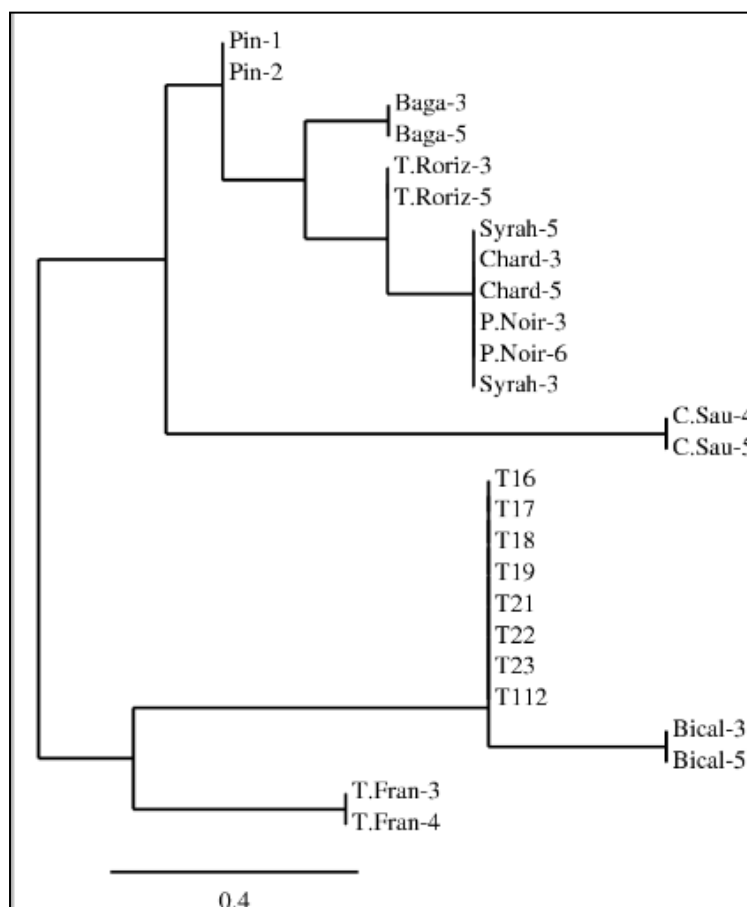


Figura 10 – Dendrograma obtido resultante da análise do SNP9, contendo 10 SNPs. Análise efetuada com o programa Phylogeny.fr. Número de bootstraps igual a 500.

Como se pode observar pela figura 10, conseguiu-se discriminar as castas Tinta Pinheira, Baga, Tinta Roriz, Cabernet Sauvignon, Touriga Nacional, Bical e a Touriga Francesa, com base nos 10 SNPs que se localizam em apenas uma única região intergénica. Recorrendo aos mesmos SNPs, não foi possível discriminar as castas Syrah, Pinot Noir e a

Chardonnay uma vez que estas estão agrupadas no mesmo ramo da árvore, e que estão filogeneticamente relacionadas entre si.

De forma a discriminar estas castas, foi adicionado outra região génica e construiu-se novamente uma árvore filogenética. Esta região localiza num exão e contém 2 SNPs.

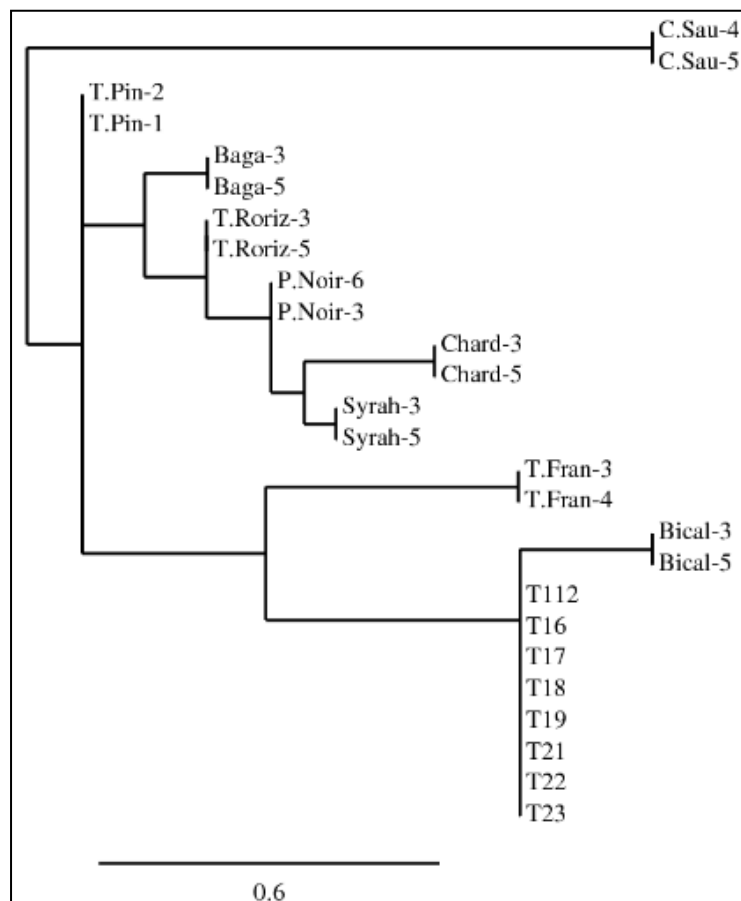


Figura 11 – Dendrograma obtido resultante da análise de duas regiões (SNP9 e SNP16), que correspondem no total 12 SNPs. Análise efetuada com o programa Phylogeny.fr. Número de bootstraps igual a 500.

Como se pode ver pela figura 11, as 10 castas estudadas são perfeitamente distinguíveis com base nestas duas regiões, que representam no total 12 SNPs. Ao comparar as imagens 9 e 10 verifica-se que as árvores não são exatamente iguais, o que seria de esperar, uma vez que para a construção da primeira árvore foram utilizados todos os SNPs detetados 32 regiões (103 SNPs). Para a segunda árvore foram utilizados apenas 12 SNPs, detetados nas duas regiões seleccionadas.

Num estudo realizado por Dong *et al.* [137] descobriram e caracterizaram 154 SNPs na *V. vinifera*. Os autores estudaram as relações genéticas em 16 castas, com base nos 154 SNPs. Com base nos resultados, os 154 SNPs permitem a distinção das castas utilizadas no estudo sendo que os SNPs localizavam-se em 17 regiões diferentes.

Neste estudo, identificamos 2 regiões hipervariáveis que permitem por si só distinguirem as 10 castas selecionadas. Estes resultados são bastantes promissores uma vez que tem o potencial de agilizar a identificação de castas de uvas. Contudo, para confirmar esta observação, será necessário estender esta análise a um grupo mais alargado de amostras.

4.4 Genotipagem de *V. vinifera* usando microssatélites

Neste trabalho, realizou-se, paralelamente, uma análise de microssatélites às 10 castas utilizadas, com objetivo de confirmar a identificação das castas e clones utilizadas neste estudo. Para tal, estudaram-se 14 loci de microssatélites. Na tabela 2 estão caracterizados os microssatélites utilizados. Atualmente, seis loci de microssatélites são consideradas, pela Organização Internacional do Vinho e da Vinha (OIV) suficientes para as identificações genéticas da maioria das castas. Neste trabalho utilizaram-se 14 marcadores de microssatélites, incluindo os 6 loci recomendados pela OIV (VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62, VrZAG79 e VVS2), mais 8 que são amplamente utilizados na genotipagem da videira no sentido de aumentar os polimorfismos da amostragem, reduzir a probabilidade de falsa identificação e elevar o grau de confiabilidade do teste. De acordo com Sefc *et al.* [144] e Laucou *et al.* [11] estes 14 loci microssatélites possuem um elevado grau de polimorfismo e poder de discriminação genética sendo capazes de caracterizar e identificar variedades de videira.

Da análise de fragmentos no 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems) resulta a medição precisa do tamanho dos alelos detetados para cada amostra para os 14 loci de microssatélites. Em anexo (anexo III) encontra-se a tabela com o tamanho dos alelos obtidos para microssatélite e para cada amostra.

Com estes resultados de microssatélites, foi então possível comparar os perfis genéticos encontrados com aqueles das variedades disponibilizadas em dados da literatura [4, 145]. Os perfis genéticos encontrados na literatura foram idênticos aos perfis genéticos obtidos neste trabalho, para 8 (VVMD27, VVMD5, VrZAG62, VVMD7, VVS2,

VrZAG79, VVMD28 e VVMD32) dos 14 loci estudados. Para os restantes loci não estão descritos para estas castas estudadas.

Os 14 loci de microssatélites, foram usados para investigar as relações entre as castas estudadas. Com base nos 14 loci de microssatélites foi possível discriminar todas as castas utilizadas neste estudo, conforme se pode observar pela figura 12, onde é visível o agrupamento das castas em diferentes ramos. No que diz respeito aos clones, uma vez mais, não foi possível distingui-los com base nos microssatélites. A não distinção entre clones da mesma casta com base nos microssatélites vai ao encontro dos resultados descritos por Imazio *et al.*, [81] e Cipriani *et al.* [82].

As 10 castas agrupam em 4 grandes grupos: A, B, C e D. No grupo A estão as castas Cabernet Sauvignon e a Baga. No grupo B encontram-se as castas de origem Internacional (Syrah, Pinot Noir e a Chardonnay). No grupo C agrupam as castas Tinta Pinheira, Bical e Tinta Roriz. No grupo D estão as castas Touriga Francesa e Touriga Nacional.

À semelhança dos resultados obtidos pelos SNPs, os resultados produzidos pelos microssatélites de uma forma geral não estão em linha com os resultados descritos na literatura [12, 79]. Lopes *et al.* [12] verificaram que as castas Touriga Nacional, Tinta Pinheira e a Touriga Francesa agrupam num *cluster* e as castas Baga, Bical e Tinta Roriz agrupam em outro *cluster*. Com base nos resultados descritos por Almadanim e colaboradores [79], as castas Baga, Tinta Pinheira, e Touriga Nacional agrupam no mesmo *cluster*. Por outro lado, as castas Bical e Tinta Roriz agrupam noutro *cluster*. As diferenças no agrupamento das castas podem ser explicadas pelo facto de o número de loci utilizados, bem como os próprios loci de microssatélites estudados serem diferentes entre os estudos anteriormente referidos.

Ao comparar o dendrograma obtido com os microssatélites, com o dendrograma obtido com os SNP (figura 9), verifica-se que a principal analogia é o agrupamento das castas Syrah, Pinot Noir e Chardonnay no mesmo *cluster*. À parte desta semelhança verificam-se algumas diferenças no agrupamento das castas. Também não seria de esperar que se obtivesse um agrupamento exatamente igual, uma vez que o *input* dos dados é diferente.

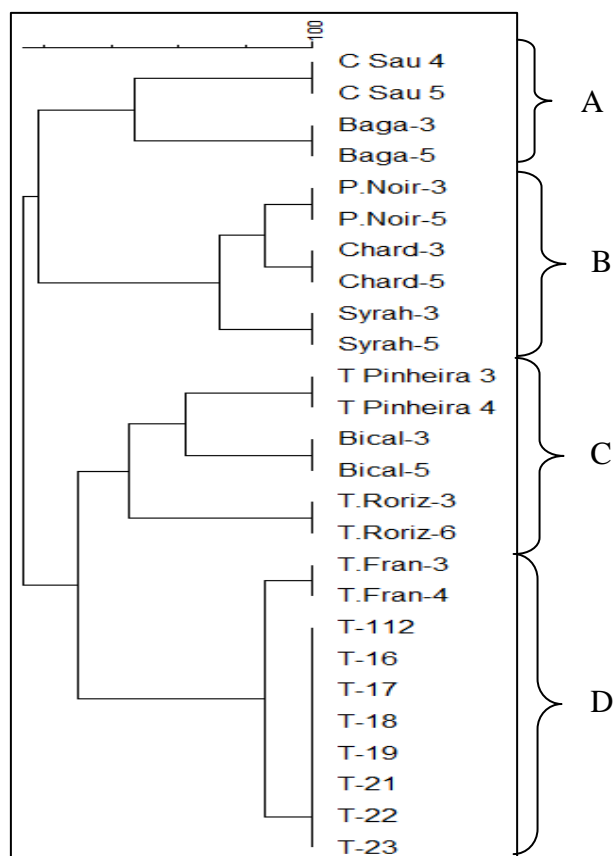


Figura 12 – Dendrograma obtido resultante da análise dos 14 loci de microssatélites. Análise efetuada com o *software* BioNumerics (Applied Maths) de acordo com o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) e o coeficiente de similaridade de *Pearson correlation*. Número de bootstraps igual a 1000.

Atualmente, os microssatélites são os marcadores moleculares utilizados para a identificação das castas de videira. Estes marcadores têm algumas vantagens relevantes para a investigação, como a sua codominância e elevados níveis de polimorfismo. Contudo, e apesar de todo o esforço dedicado à genotipagem de microssatélites, e à padronização dos tamanhos de alelos, ainda são frequentes os problemas na identificação do tamanho dos alelos de ADN entre os laboratórios utilizando diferentes tecnologias de separação de fragmentos [133, 138].

Os SNPs por serem marcadores bi-alelicos, a identificação do alelo é categórica, e também permite o estabelecimento de relações filogenética entre diferentes castas. Assim, o recurso aos SNPs como marcadores moleculares apresentam-se como uma boa alternativa à utilização de microssatélites, pois a sua tecnologia é mais uniformizada, e não existem problemas ao nível da comparação interlaboratorial [133, 138].

V. Conclusão

5 Conclusão

A espécie *V. vinifera* compreende muitas variedades, as denominadas castas e clones. A distinção inter e intra casta é de extrema importância, pelo facto de as variedades de uva terem um efeito direto sobre a qualidade final do vinho. Assim, a seleção e identificação de castas e clones é uma preocupação primordial para a qualidade do vinho.

Com o objetivo de desenvolver uma ferramenta molecular que permitisse identificar castas e clones de *V. vinífera*, avaliou-se o potencial da utilização de SNPs como marcadores moleculares. Selecionaram-se 32 regiões que contêm SNPs para estudar as diferenças genéticas em 10 castas. Com base nos resultados, identificaram-se 103 SNPs nas 32 regiões estudadas, o que permitiu a distinção de todas as castas estudadas. Das 32 regiões, verificou-se que 2 regiões, que representam um total de 12 SNPs, *per si*, são suficientes para distinguir as 10 castas.

Neste trabalho também se avaliou a utilização de microssatélites com o intuito de identificar castas e clones de *V. vinifera*, e assim comparar os resultados obtidos pelos 2 marcadores moleculares. Utilizaram-se um total de 14 loci de microssatélites (6 loci de microssatélites recomendados pela OIV, e adicionalmente 8 loci). Com base nos resultados foi possível discriminar as 10 castas estudadas com base nos 14 loci de microssatélites.

Apesar de as castas serem perfeitamente distinguíveis com os SNPs e com os microssatélites, um dos objetivos deste trabalho consistia na discriminação de clones da mesma casta. Este objetivo não foi possível de alcançar com os dois tipos de marcadores utilizados.

Para além da distinção de castas, os resultados obtidos foram utilizados para estabelecerem relações filogenéticas entre as castas. Com base nos resultados, conclui-se que não há uma conformidade entre o agrupamento das castas nacionais, comparando os dados obtidos na literatura. No entanto, esta dissonância não é exclusiva do nosso estudo, estando também patente noutros estudos. Contudo o agrupamento das castas Pinot Noir, Chardonnay e Syrah vai ao encontro com os resultados obtidos na literatura.

Com este trabalho demonstrou-se que os SNPs são marcadores alternativos para a distinção de castas de videira. Apesar destes resultados serem bastantes atrativos, será necessário alargar o estudo para um maior número de castas, para verificar se as duas regiões identificadas são suficientes para distinguir um maior número de castas.

Como trabalho futuro, sugere-se a inclusão de mais regiões que contêm SNPs, no sentido de aumentar a probabilidade de encontrar SNPs que permitem a distinção de clones de videira.

VI. Referência bibliográficas

6 Referências bibliográficas

1. Grainger, K. and Tattersall, H., *Wine production: Vine to bottle* B. Publishing, Editor. 2005. p. 5-6.
2. Troggio, M., Vezzulli, S., Pindo, M., Malacarne, G., Fontana, P., Moreira, F.M., Costantini, L., Grando, M.S., Viola, R., and Velasco, R., *Asev honorary research lecture 2007*. American Journal of Enology and Viticulture, 2008. **59**(2): p. 117-127.
3. This, P., Lacombe, T., and Thomas, M.R., *Historical origins and genetic diversity of wine grapes*. Trends in Genetics, 2006. **22**(9): p. 511-519.
4. Castro, I., Martín, J.P., Ortiz, J.M., and Pinto-Carnide, O., *Varietal discrimination and genetic relationships of vitis vinifera l. Cultivars from two major controlled appellation (doc) regions in portugal*. Scientia Horticulturae, 2011. **127**(4): p. 507-514.
5. Baleiras-Couto, M.M. and Eiras-Dias, J.E., *Detection and identification of grape varieties in must and wine using nuclear and chloroplast microsatellite markers*. Analytica Chimica Acta, 2006. **563**(1-2): p. 283-291.
6. Ronald, J.S., 2 - *grape species and varieties*, in *Wine science (third edition)*. 2008, Academic Press: San Diego. p. 15-II.
7. Bessis, R., *Evolution of the grapevine (vitis vinifera l.) imprinted by natural and human factors*. Canadian Journal of Botany, 2007. **85**(8): p. 679-690.
8. Hamilakis, Y., *Ancient wine. The search for the origins of viniculture*. Agricultural History Review, 2004. **52**: p. 225-227.
9. Terral, J.F., *Quantitative anatomical criteria for discriminating wild grapevine (vitis vinifera ssp. Sylvestris) from cultivated vines (vitis vinifera ssp. Vinifera)*, British Archaeological R. International Series, Editor. 2002. p. 59-64.
10. Myles, S., Boyko, A.R., Owens, C.L., Brown, P.J., Grassi, F., Aradhya, M.K., Prins, B., Reynolds, A., Chia, J.M., Ware, D., Bustamante, C.D., and Buckler, E.S., *Genetic structure and domestication history of the grape*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011. **108**(9): p. 3530-3535.
11. Laucou, V., Lacombe, T., Dechesne, F., Siret, R., Bruno, J.P., Dessup, M., Dessup, T., Ortigosa, P., Parra, P., Roux, C., Santoni, S., Varès, D., Péros, J.P., Boursiquot, J.M., and This, P., *High throughput analysis of grape genetic diversity as a tool for germplasm collection management*. Theoretical and Applied Genetics, 2011. **122**(6): p. 1233-1245.

12. Lopes, M.S., Santos, M.R., Dias, J.E.E., Mendonca, D., and Machado, A.D., *Discrimination of portuguese grapevines based on microsatellite markers*. Journal of Biotechnology, 2006. **127**(1): p. 34-44.
13. Veloso, M.M., Almandanim, M.C., Baleiras-Couto, M., Pereira, H.S., Carneiro, L.C., Pedro Fevereiro, and Eiras-Dias, J.E., *Microsatellite database of grapevine (vitis vinifera l.) cultivars used for wine production in portugal*. Ciência e Técnica Vitivinícola, 2010. **25**(2): p. 53-61.
14. Arroyo-Garcia, R., Ruiz-Garcia, L., Bolling, L., Ocete, R., Lopez, M.A., Arnold, C., Ergul, A., Soylemezoglu, G., Uzun, H.I., Cabello, F., Ibanez, J., Aradhya, M.K., Atanassov, A., Atanassov, I., Balint, S., Cenis, J.L., Costantini, L., Goris-Lavets, S., Grando, M.S., Klein, B.Y., McGovern, P.E., Merdinoglu, D., Pejic, I., Pelsy, F., Primikirios, N., Risovannaya, V., Roubelakis-Angelakis, K.A., Snoussi, H., Sotiri, P., Tamhankar, S., This, P., Troshin, L., Malpica, J.M., Lefort, F., and Martinez-Zapater, J.M., *Multiple origins of cultivated grapevine (vitis vinifera l. Ssp sativa) based on chloroplast DNA polymorphisms*. Molecular Ecology, 2006. **15**(12): p. 3707-3714.
15. Haas, H.U., Budahn, H., and Alleweldt, G., *In-situ hybridization in vitis vinifera l.* Vitis, 1994. **33**(4): p. 251-252.
16. Reustle, G., Harst, M., and Alleweldt, G., *Regeneration of grapevine (vitis spp.) protoplasts*. Vitis, 1994. **33**(3): p. 173-174.
17. Forneck, A., *Plant breeding: Clonality — a concept for stability and variability during vegetative propagation progress in botany*, K. Esser, et al., Editors. 2005, Springer Berlin Heidelberg. p. 164-183.
18. Pelsy, F., *Molecular and cellular mechanisms of diversity within grapevine varieties*. Heredity, 2010. **104**(4): p. 331-340.
19. Anderson, M.M., Smith, R.J., Williams, M.A., and Wolpert, J.A., *Viticultural evaluation of french and california pinot noir clones grown for production of sparkling wine*. American Journal of Enology and Viticulture, 2008. **59**(2): p. 188-193.
20. Duchêne, E., Legras, J.L., Karst, F., Merdinoglu, D., Claudel, P., Jaegli, N., and Pelsy, F., *Variation of linalool and geraniol content within two pairs of aromatic and non-aromatic grapevine clones*. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2009. **15**(2): p. 120-130.
21. Kaeppler, S.M., Kaeppler, H.F., and Rhee, Y., *Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants*. Plant Molecular Biology, 2000. **43**(2-3): p. 179-188.
22. Walter, B. and Martelli, G.P., *Considerations on grapevine selection and certification*. Vitis, 1998. **37**: p. 87-90.
23. Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davis, J.F.T., and Geneve, R.L., *Plant propagation: Principles and practices*. 7th ed, ed. P.H.U.S. River. 2001, NJ, USA. 880.

24. Benjak, A., *Analysis of transposable elements in grapevine (vitis vinifera l.)*, in *Department für angewandte Pflanzenwissenschaften und Pflanzenbiotechnologie*. November 2008, Universität für Bodenkultur: Wien. p. 134.
25. Boss, P.K. and Thomas, M.R., *Association of dwarfism and floral induction with a grape 'green revolution' mutation*. *Nature*, 2002. **416**(6883): p. 847-850.
26. Coccozza, C., Cherubini, P., Regier, N., Saurer, M., Frey, B., and Tognetti, R., *Early effects of water deficit on two parental clones of populus nigra grown under different environmental conditions*. *Functional Plant Biology*, 2010. **37**(3): p. 244-254.
27. Visser, C.P., *Clonal selection of chardonnay grapevines in south africa*. *Proceedings of the international symposium on clonal selection*, ed. J.M. Rantz. 1995, Davis: American Society Enology & Viticulture. 157-158.
28. Schulman, A.H., *Molecular markers to assess genetic diversity*. *Euphytica*, 2007. **158**(3): p. 313-321.
29. Carimi, F., Mercati, F., De Michele, R., Fiore, M.C., Riccardi, P., and Sunseri, F., *Intra-varietal genetic diversity of the grapevine (vitis vinifera l.) cultivar 'nero d'avola' as revealed by microsatellite markers*. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2011. **58**(7): p. 967-975.
30. Sefc, K.M., Lefort, F., Grando, M.S., Scott, K.D., Steinkellner, H., and Thomas, M.R., *Microsatellite markers for grapevine: A state of the art* *Molecular Biology & Biotechnology of Grapevine*, 2001.
31. Isci, B., Yildirim, H.K., and Altindisli, A., *A review of the authentication of wine origin by molecular markers*. *Journal of the Institute of Brewing*, 2009. **115**(3): p. 259-264.
32. Jehan, T. and Suman, L., *Single nucleotide polymorphism (snp)-methods and applications in plant genetics: A review*. *Indian Journal of Biotechnology*, 2006. **5**: p. 435-459.
33. Kumar, P., Gupta, V.K., Misra, A.K., Modi, D.R., and Pandey, B.K., *Potential of molecular markers in plant biotechnology*. *Plant Omics*, 2009. **2**(4): p. 141-162.
34. Benin, Gasquez, J., Mahfoudi, A., and Bessis, R., *Caractérisation biochimique des cépages de vitis vinifera l. Par électrophorèse d'isoenzymes foliaires: Essai de classification des variétés*. *Vitis*, 1988. **27**: p. 157-172.
35. Eiras-Dias, J.E., Sousa, S., Cabral, F., and Carralho, I., *Isoenzymatic characterization of portuguese vine varieties of vitis vinifera l.* *Viticulture and Enology*, 1989. **42**: p. 23-26.
36. Calo, A., Costacurta, A., Paludetti, G., Calo, G., Aruselkar, S., and Parfit, D., *The use of isoenzyme markers to characterize grape cultivars*. *Viticulture and Enology*, 1989. **42**: p. 15-22.

37. Parfitt, D.E. and Arulsekhar, S., *Inheritance and isozyme diversity for gpi and pgm among grape cultivars*. Journal of the American Society for Horticultural Science, 1989. **114**(3): p. 486-491.
38. Walters, T.W., Posluszny, U., and Kevan, P.G., *Isozyme analysis of the grape (vitis). I. A practical solution*. Canadian Journal of Botany, 1989. **67**(10): p. 2894-2899.
39. Mondini, L., Noorani, A., and Pagnotta, M., *Assessing plant genetic diversity by molecular tools*. Diversity, 2009. **1**(1): p. 19-35.
40. Striem, M.J., Spiegelroy, P., Benhayyim, G., Beckmann, J., and Gidoni, D., *Genomic DNA fingerprinting of vitis vinifera by the use of multi-loci probes*. Vitis, 1990. **29**(4): p. 223-227.
41. Bourquin, J.C., Sonko, A., Otten, L., and Walter, B., *Restriction-fragment-length-polymorphism and molecular taxonomy in vitis vinifera l*. Theoretical and Applied Genetics, 1993. **87**(4): p. 431-438.
42. Bourquin, J.C., Otten, L., and Walter, B., *Pcr-rflp analysis of vitis, ampelopsis and parthenocissus and its application to the identification of rootstocks*. Vitis, 1995. **34**(2): p. 103-108.
43. Guerra, B. and Meredith, C.P., *Comparison of vitis berlandieri x vitis riparia rootstock cultivars by restriction-fragment-length-polymorphism analysis*. Vitis, 1995. **34**(2): p. 109-112.
44. Semagn, K., Bjørnstad, Å., and Ndjiondjop, M.N., *An overview of molecular marker methods for plants*. African Journal of Biotechnology, 2006. **5**(25): p. 2540-2568.
45. Agarwal, M., Shrivastava, N., and Padh, H., *Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences*. Plant Cell Reports, 2008. **27**(4): p. 617-631.
46. Welsh, J. and McClelland, M., *Fingerprinting genomes using pcr with arbitrary primers*. Nucleic Acids Research, 1990. **18**(24): p. 7213-7218.
47. Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V., *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic-markers*. Nucleic Acids Research, 1990. **18**(22): p. 6531-6535.
48. Kiss, G.B., Csanádi, G., Kálmán, K., Kaló, P., and Ökrész, L., *Construction of a basic genetic map for alfalfa using rflp, rapd, isozyme and morphological markers*. Molecular and General Genetics, 1993. **238**(1): p. 129-137.
49. Torres, A.M., Weeden, N.F., and Martin, A., *Linkage among isozyme, rflp and rapd markers in vicia faba*. Theoretical and Applied Genetics, 1993. **85**(8): p. 937-945.

50. Hemmat, M., Weeden, N.F., Manganaris, A.G., and Lawson, D.M., *Molecular marker linkage map for apple*. Journal of Heredity, 1994. **85**(1): p. 4-11.
51. Lodhi, M.A., Daly, M.J., Ye, G.N., Weeden, N.F., and Reisch, B.I., *A molecular marker based linkage map of vitis*. Genome, 1995. **38**(4): p. 786-794.
52. Xu, H. and Bakalinsky, A.T., *Identification of grape (vitis) rootstocks using sequence characterized amplified region DNA markers*. Hortscience, 1996. **31**(2): p. 267-268.
53. Stavrakakis, M.N. and Biniari, K., *Genetic study of grape cultivars belonging to the muscat family by random amplified polymorphic DNA markers*. Vitis, 1998. **37**(3): p. 119-122.
54. Ye, G.N., Soylemezoglu, G., Weeden, N.F., Lamboy, W.F., Pool, R.M., and Reisch, B.I., *Analysis of the relationship between grapevine cultivars, sports and clones via DNA fingerprinting*. Vitis, 1998. **37**(1): p. 33-38.
55. Herrera, R., Cares, V., Wilkinson, M.J., and Caligari, P.D.S., *Characterisation of genetic variation between vitis vinifera cultivars from central chile using rapd and inter simple sequence repeat markers*. Euphytica, 2002. **124**(1): p. 139-145.
56. Althoff, D.M., Gitzendanner, M.A., and Segraves, K.A., *The utility of amplified fragment length polymorphisms in phylogenetics: A comparison of homology within and between genomes*. Systematic Biology, 2007. **56**(3): p. 477-484.
57. Martinez, L., Cavagnaro, P., Masuelli, R., and Rodriguez, J., *Evaluation of diversity among argentine grapevine (vitis vinifera l.) varieties using morphological data and aflp markers*. Electronic Journal of Biotechnology, 2003. **6**(3): p. 244-253.
58. Fanizza, G., Chaabane, R., Lamaj, F., Ricciardi, L., and Resta, P., *Aflp analysis of genetic relationships among aromatic grapevines (vitis vinifera)*. Theoretical and Applied Genetics, 2003. **107**(6): p. 1043-1047.
59. Litt, M. and Luty, J.A., *A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene*. The American Journal of Human Genetics, 1989. **44**(3): p. 397-401.
60. Tautz, D., *Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers*. Nucleic Acids Research, 1989. **17**(16): p. 6463-6471.
61. Weber, J.L. and May, P.E., *Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction*. The American Journal of Human Genetics, 1989. **44**(3): p. 388-396.
62. Oliveira, E.J., Padua, J.G., Zucchi, M.I., Vencovsky, R., and Vieira, M.L.C., *Origin, evolution and genome distribution of microsatellites*. Genetics and Molecular Biology, 2006. **29**(2): p. 294-307.

63. Delseny, M., Laroche, M., and Penon, P., *Detection of sequences with z-DNA forming potential in higher-plants*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1983. **116**(1): p. 113-120.
64. Toth, G., Gaspari, Z., and Jurka, J., *Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis*. Genome Research, 2000. **10**(7): p. 967-81.
65. Kalia, R.K., Rai, M.K., Kalia, S., Singh, R., and Dhawan, A.K., *Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants*. Euphytica, 2011. **177**(3): p. 309-334.
66. Bhargava, A. and Fuentes, F.F., *Mutational dynamics of microsatellites*. Molecular Biotechnology, 2010. **44**(3): p. 250-266.
67. Puzovic, D., Popovic, B., Novakovic, I., and Milasin, J., *Analysis of microsatellite markers d18s70 and d20s116 in DNA isolated from dentin: Use in forensic medicine*. Srpski Arhiv Za Celokupno Lekarstvo, 2009. **137**(1-2): p. 43-46.
68. Testolin, R., Marrazzo, T., Cipriani, G., Quarta, R., Verde, I., Dettori, M.T., Pancaldi, M., and Sansavini, S., *Microsatellite DNA in peach (prunus persica l. Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars*. Genome, 2000. **43**(3): p. 512-520.
69. Liebhard, R., Gianfranceschi, L., Koller, B., Ryder, C.D., Tarchini, R., Van De Weg, E., and Gessler, C., *Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (malus x domestica borkh.)*. Molecular Breeding, 2002. **10**(4): p. 217-241.
70. Ulanovsky, S., Gogorcena, Y., Martínez de Toda, F., and Ortiz, J.M., *Use of molecular markers in detection of synonymies and homonymies in grapevines (vitis vinifera l.)*. Scientia Horticulturae, 2002. **92**(3-4): p. 241-254.
71. Jesús, M.O., Pedro, J.M., Borrego, J., Chávez, J., Rodríguez, I., Muñoz, G., and Cabello, F., *Molecular and morphological characterization of a vitis gene bank for the establishment of a base collection*. Genetic Resources and Crop Evolution, 2004. **51**(4): p. 403-409.
72. Thomas, M.R. and Scott, N.S., *Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analyzed as sequence-tagged sites (stss)*. Theoretical and Applied Genetics, 1993. **86**(8): p. 985-990.
73. Sefc, K.M., Steinkellner, H., Wagner, H.W., Glossl, J., and Regner, F., *Application of microsatellite markers to parentage studies in grapevine*. Vitis, 1997. **36**(4): p. 179-183.
74. Bowers, J.E., Dangl, G.S., Vignani, R., and Meredith, C.P., *Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (vitis vinifera l.)*. Genome, 1996. **39**(4): p. 628-633.

75. Lefort, F., Kyvelos, C.J., Zervou, M., Edwards, K.J., and Roubelakis-Angelakis, K.A., *Characterization of new microsatellite loci from vitis vinifera and their conservation in some vitis species and hybrids*. Molecular Ecology Notes, 2002. **2**(1): p. 20-21.
76. Merdinoglu, D., Butterlin, G., Bevilacqua, L., Chiquet, V., Adam-Blondon, A.-F., and Decroocq, S., *Development and characterization of a large set of microsatellite markers in grapevine (<i>vitis vinifera</i> l.) suitable for multiplex pcr*. Molecular Breeding, 2005. **15**(4): p. 349-366.
77. Merdinoglu, D., Butterlin, G., Bevilacqua, L., Chiquet, V., Adam-Blondon, A.F., and Decroocq, S., *Development and characterization of a large set of microsatellite markers in grapevine (vitis vinifera l.) suitable for multiplex pcr*. Molecular Breeding, 2005. **15**(4): p. 349-366.
78. Bowers, J.E., Dangl, G.S., and Meredith, C.P., *Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape*. American Journal of Enology and Viticulture, 1999. **50**(3): p. 243-246.
79. Arroyo-Garcia, R. and Martinez-Zapater, J.M., *Development and characterization of new microsatellite markers for grape*. Vitis, 2004. **43**(4): p. 175-178.
80. Almadanim, M.C., Baleiras Couto, M.M., Pereira, H.S., Carneiro, L.C., Manuel, P.F., Eiras-Dias, J.E., Morais-Cecilio, L., Viegas, W., and Veloso, M.M., *Genetic diversity of the grapevine (vitis vinifera l. Cultivars most utilized for wine production in portugal*. Vitis, 2007. **46**(3): p. 116-119.
81. Imazio, S., Labra, M., Grassi, F., Winfield, M., Bardini, M., and Scienza, A., *Molecular tools for clone identification: The case of the grapevine cultivar 'traminer'*. Plant Breeding, 2002. **121**(6): p. 531-535.
82. Cipriani, G., Spadotto, A., Jurman, I., Di Gaspero, G., Crespan, M., Meneghetti, S., Frare, E., Vignani, R., Cresti, M., Morgante, M., Pezzotti, M., Pe, E., Policriti, A., and Testolin, R., *The ssr-based molecular profile of 1005 grapevine (vitis vinifera l.) accessions uncovers new synonymy and parentages, and reveals a large admixture amongst varieties of different geographic origin*. Theoretical and Applied Genetics, 2010. **121**(8): p. 1569-85.
83. Thomas, M.R., Cain, P., and Scott, N.S., *DNA typing of grapevines - a universal methodology and database for describing cultivars and evaluating genetic relatedness*. Plant Molecular Biology, 1994. **25**(6): p. 939-949.
84. Botta, R., Scott, N.S., Eynard, I., and Thomas, M.R., *Evaluation of microsatellite sequence-tagged site markers for characterizing vitis vinifera cultivars*. Vitis, 1995. **34**(2): p. 99-102.
85. Sefc, K.M., Regner, F., Glossl, J., and Steinkellner, H., *Genotyping of grapevine and rootstock cultivars using microsatellite markers*. Vitis, 1998. **37**(1): p. 15-20.

86. Grando, M.S. and Frisinghelli, C., *Grape microsatellite markers: Sizing of DNA alleles and genotype analysis of some grapevine cultivars*. Vitis, 1998. **37**(2): p. 79-82.
87. Thomas, M.R., Matsumoto, S., Cain, P., and Scott, N.S., *Repetitive DNA of grapevine - classes present and sequences suitable for cultivar identification*. Theoretical and Applied Genetics, 1993. **86**(2-3): p. 173-180.
88. Di Vecchi-Staraz, M., Bandinelli, R., Boselli, M., This, P., Boursiquot, J.M., Laucou, V., Lacombe, T., and Vares, D., *Genetic structuring and parentage analysis for evolutionary studies in grapevine: Kin group and origin of the cultivar sangiovese revealed*. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2007. **132**(4): p. 514-524.
89. Boursiquot, J.M., Lacombe, T., Laucou, V., Julliard, S., Perrin, F.X., Lanier, N., Legrand, D., Meredith, C., and This, P., *Parentage of merlot and related winegrape cultivars of southwestern france: Discovery of the missing link*. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2009. **15**(2): p. 144-155.
90. Vouillamoz, J.F., Monaco, A., Costantini, L., Stefanini, M., Scienza, A., and Grando, M.S., *The parentage of 'sangiovese', the most important italian wine grape*. Vitis, 2007. **46**(1): p. 19-22.
91. Goryslavets, S., Risovanna, V., Bacilieri, R., Hausman, J.F., and Heuertz, M., *A parentage study of closely related ukrainian wine grape varieties using microsatellite markers*. Cytology and Genetics, 2010. **44**(2): p. 95-102.
92. Bowers, J.E. and Meredith, C.P., *The parentage of a classic wine grape, cabernet sauvignon*. Nature Genetics, 1997. **16**(1): p. 84-7.
93. Doligez, A., Bouquet, A., Danglot, Y., Lahogue, F., Riaz, S., Meredith, C.P., Edwards, K.J., and This, P., *Genetic mapping of grapevine (vitis vinifera l.) applied to the detection of qtls for seedlessness and berry weight*. Theoretical and Applied Genetics, 2002. **105**(5): p. 780-795.
94. Fanizza, G., Lamaj, F., Costantini, L., Chaabane, R., and Grando, M.S., *Qtl analysis for fruit yield components in table grapes (vitis vinifera)*. Theoretical and Applied Genetics, 2005. **111**(4): p. 658-664.
95. Doligez, A., Audiot, E., Baumes, R., and This, P., *Qtls for muscat flavor and monoterpenic odorant content in grapevine (vitis vinifera l.)*. Molecular Breeding, 2006. **18**(2): p. 109-125.
96. Doligez, A., Bertrand, Y., Dias, S., Grolier, M., Ballester, J.F., Bouquet, A., and This, P., *Qtls for fertility in table grape (vitis vinifera l.)*. Tree Genetics & Genomes, 2010. **6**(3): p. 413-422.
97. Riaz, S., Tenscher, A.C., Ramming, D.W., and Walker, M.A., *Using a limited mapping strategy to identify major qtls for resistance to grapevine powdery mildew*

- (*erysiphe necator*) and their use in marker-assisted breeding. Theoretical and Applied Genetics, 2011. **122**(6): p. 1059-1073.
98. Dalbo, M.A., Ye, G.N., Weeden, N.F., Steinkellner, H., Sefc, K.M., and Reisch, B.I., *A gene controlling sex in grapevines placed on a molecular marker-based genetic map*. Genome, 2000. **43**(2): p. 333-340.
 99. Fischer, B., Salakhutdinov, I., Akkurt, M., Kortekamp, A., Eibach, R., Topfer, R., and Zyprian, E., *Molecular mapping of regent x lemler and qtl-analysis of agronomic traits*, in *Proceedings of the 8th international conference on grape genetics and breeding, vols 1 and 2*, E. Hajdu and E. Borbas, Editors. 2003, International Society Horticultural Science: Leuven 1. p. 69-71.
 100. Doligez, A., Adam-Blondon, A.F., Cipriani, G., Laucou, V., Merdinoglu, D., Meredith, C.P., Riaz, S., Roux, C., This, P., and Di Gaspero, G., *An integrated ssr map of grapevine based on five mapping populations*. Theoretical and Applied Genetics, 2006. **113**(3): p. 369-382.
 101. Welter, L.J., Gokturk-Baydar, N., Akkurt, M., Maul, E., Eibach, R., Topfer, R., and Zyprian, E.M., *Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (vitis vinifera l.)*. Molecular Breeding, 2007. **20**(4): p. 359-374.
 102. Moroldo, M., Paillard, S., Marconi, R., Fabrice, L., Canaguier, A., Cruaud, C., De Berardinis, V., Guichard, C., Brunaud, V., Le Clainche, I., Scalabrin, S., Testolin, R., Di Gaspero, G., Morgante, M., and Adam-Blondon, A.-F., *A physical map of the heterozygous grapevine 'cabernet sauvignon' allows mapping candidate genes for disease resistance*. BioMed Central Plant Biology, 2008. **8**(1): p. 66.
 103. Salmaso, M., Malacarne, G., Troggio, M., Faes, G., Stefanini, M., Grando, M.S., and Velasco, R., *A grapevine (vitis vinifera l.) genetic map integrating the position of 139 expressed genes*. Theoretical and Applied Genetics, 2008. **116**(8): p. 1129-1143.
 104. Vezzulli, S., Troggio, M., Coppola, G., Jermakow, A., Cartwright, D., Zharkikh, A., Stefanini, M., Grando, M.S., Viola, R., Adam-Blondon, A.F., Thomas, M., This, P., and Velasco, R., *A reference integrated map for cultivated grapevine (vitis vinifera l.) from three crosses, based on 283 ssr and 501 snp-based markers*. Theoretical and Applied Genetics, 2008. **117**(4): p. 499-511.
 105. Scalabrin, S., Troggio, M., Moroldo, M., Pindo, M., Felice, N., Coppola, G., Prete, G., Malacarne, G., Marconi, R., Faes, G., Jurman, I., Grando, S., Jesse, T., Segala, C., Valle, G., Policriti, A., Fontana, P., Morgante, M., and Velasco, R., *Physical mapping in highly heterozygous genomes: A physical contig map of the pinot noir grapevine cultivar*. BioMed Central Genomics, 2010. **11**.
 106. Costantini, L., Monaco, A., Vouillamoz, J.F., Forlani, M., and Grando, M.S., *Genetic relationships among local vitis vinifera cultivars from campania (italy)*. Vitis, 2005. **44**(1): p. 25-34.

107. Cipriani, G., Marrazzo, M.T., Di Gaspero, G., Pfeiffer, A., Morgante, M., and Testolin, R., *A set of microsatellite markers with long core repeat optimized for grape (vitis spp.) genotyping*. BioMed Central Plant Biology, 2008. **8**.
108. Vilanova, M., Fuente, M., Fernandez-Gonzalez, M., and Masa, A., *Identification of new synonymies in minority grapevine cultivars from galicia (spain) using microsatellite analysis*. American Journal of Enology and Viticulture, 2009. **60**(2): p. 236-240.
109. Schuck, M.R., Moreira, F.M., Guerra, M.P., Voltolini, J.A., Grando, M.S., and Silva, A.L., *Molecular characterization of grapevine from santa catarina, brazil, using microsatellite markers*. Pesquisa Agropecuaria Brasileira, 2009. **44**(5): p. 487-495.
110. Carimi, F., Mercati, F., Abbate, L., and Sunseri, F., *Microsatellite analyses for evaluation of genetic diversity among sicilian grapevine cultivars*. Genetic Resources and Crop Evolution, 2010. **57**(5): p. 703-719.
111. Buhner-Zaharieva, T., Moussaoui, S., Lorente, M., Andreu, J., Nunez, R., Ortiz, J.M., and Gogorcena, Y., *Preservation and molecular characterization of ancient varieties in spanish grapevine germplasm collections*. American Journal of Enology and Viticulture, 2010. **61**(4): p. 557-562.
112. Losada, E.D., Salgado, A.T., Ramos-Cabrera, A.M., Segade, S.R., Dieguez, S.C., and Pereira-Lorenzo, S., *Twenty microsatellites (ssrs) reveal two main origins of variability in grapevine cultivars from northwestern spain*. Vitis, 2010. **49**(2): p. 55-62.
113. Lopes, M.S., Sefc, K.M., Eiras Dias, E., Steinkellner, H., Laimer Câmara Machado, M., and Câmara Machado, A., *The use of microsatellites for germplasm management in a portuguese grapevine collection*. Theoretical and Applied Genetics, 1999. **99**(3): p. 733-739.
114. Cervera, M.T., Cabezas, J.A., Sancha, J.C., Toda, F.M., and Martinez-Zapater, J.M., *Application of aflps to the characterization of grapevine vitis vinifera l. Genetic resources. A case study with accessions from rioja (spain)*. Theoretical and Applied Genetics, 1998. **97**(1-2): p. 51-59.
115. Blaich, R., Konradi, J., Ruhl, E., and Forneck, A., *Assessing genetic variation among pinot noir (vitis vinifera l.) clones with aflu markers*. American Journal of Enology and Viticulture, 2007. **58**(4): p. 526-529.
116. Meneghetti, S., Costacurta, A., Frare, E., Da Rold, G., Migliaro, D., Morreale, G., Crespan, M., Sotés, V., and Calò, A., *Clones identification and genetic characterization of garnacha grapevine by means of different pcr-derived marker systems*. Molecular Biotechnology, 2011. **48**(3): p. 244-254.

117. Liao, P.Y. and Lee, K.H., *From snps to functional polymorphism: The insight into biotechnology applications*. Biochemical Engineering Journal, 2010. **49**(2): p. 149-158.
118. Griffin, T.J. and Smith, L.M., *Single-nucleotide polymorphism analysis by maldi-tof mass spectrometry (reprinted from trends in biotechnology, vol 18, pg 77-84, 2000)*. Trends in Genetics, 2002: p. S10-S18.
119. Gupta, P.K., Roy, J.K., and Prasad, M., *Single nucleotide polymorphisms: A new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants*. Current Science, 2001. **80**(4): p. 524-535.
120. Schlotterer, C., *The evolution of molecular markers - just a matter of fashion?* Nature Reviews Genetics, 2004. **5**(1): p. 63-69.
121. Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M., and Eggen, A., *A review on snp and other types of molecular markers and their use in animal genetics*. Genetics Selection Evolution, 2002. **34**(3): p. 275-305.
122. Kwok, P.Y., Deng, Q., Zakeri, H., Taylor, S.L., and Nickerson, D.A., *Increasing the information content of sts-based genome maps: Identifying polymorphisms in mapped stss*. Genomics, 1996. **31**(1): p. 123-6.
123. Sachidanandam, R., Weissman, D., Schmidt, S.C., Kakol, J.M., Stein, L.D., Marth, G., Sherry, S., Mullikin, J.C., Mortimore, B.J., Willey, D.L., Hunt, S.E., Cole, C.G., Coggill, P.C., Rice, C.M., Ning, Z.M., Rogers, J., Bentley, D.R., Kwok, P.Y., Mardis, E.R., Yeh, R.T., Schultz, B., Cook, L., Davenport, R., Dante, M., Fulton, L., Hillier, L., Waterston, R.H., McPherson, J.D., Gilman, B., Schaffner, S., Van Etten, W.J., Reich, D., Higgins, J., Daly, M.J., Blumenstiel, B., Baldwin, J., Stange-Thomann, N.S., Zody, M.C., Linton, L., Lander, E.S., and Altshuler, D., *A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 928-933.
124. Ching, A., Caldwell, K.S., Jung, M., Dolan, M., Smith, O.S., Tingey, S., Morgante, M., and Rafalski, A.J., *Snp frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines*. BioMed Central Genetics, 2002. **3**.
125. Elahi, E., Kumm, J., and Ronaghi, M., *Global genetic analysis*. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2004. **37**(1): p. 11-27.
126. Rostoks, N., Mudie, S., Cardle, L., Russell, J., Ramsay, L., Booth, A., Svensson, J.T., Wanamaker, S.I., Walia, H., Rodriguez, E.M., Hedley, P.E., Liu, H., Morris, J., Close, T.J., Marshall, D.F., and Waugh, R., *Genome-wide snp discovery and linkage analysis in barley based on genes responsive to abiotic stress*. Molecular Genetics and Genomics, 2005. **274**(5): p. 515-527.
127. Zhu, Y.L., Song, Q.J., Hyten, D.L., Van Tassell, C.P., Matukumalli, L.K., Grimm, D.R., Hyatt, S.M., Fickus, E.W., Young, N.D., and Cregan, P.B., *Single-nucleotide polymorphisms in soybean*. Genetics, 2003. **163**(3): p. 1123-1134.

128. Schmid, K.J., Sorensen, T.R., Stracke, R., Torjek, O., Altmann, T., Mitchell-Olds, T., and Weisshaar, B., *Large-scale identification and analysis of genome-wide single-nucleotide polymorphisms for mapping in arabidopsis thaliana*. Genome Research, 2003. **13**(6): p. 1250-1257.
129. Vezzulli, S., Micheletti, D., Riaz, S., Pindo, M., Viola, R., This, P., Walker, M.A., Troggio, M., and Velasco, R., *A snp transferability survey within the genus vitis*. BioMed Central Plant Biology, 2008. **8**.
130. Salmaso, M., Faes, G., Segala, C., Stefanini, M., Salakhutdinov, L., Zyprian, E., Toepfer, R., Grando, M.S., and Velasco, R., *Genome diversity and gene haplotypes in the grapevine (vitis vinifera l.), as revealed by single nucleotide polymorphisms*. Molecular Breeding, 2004. **14**(4): p. 385-395.
131. Myles, S., Chia, J.M., Hurwitz, B., Simon, C., Zhong, G.Y., Buckler, E., and Ware, D., *Rapid genomic characterization of the genus vitis*. PLoS ONE, 2010. **5**(1).
132. Pindo, M., Vezzulli, S., Coppola, G., Cartwright, D.A., Zharkikh, A., Velasco, R., and Troggio, M., *Snp high-throughput screening in grapevine using the snplex (tm) genotyping system*. BioMed Central Plant Biology, 2008. **8**.
133. Lijavetzky, D., Cabezas, J.A., Ibanez, A., Rodriguez, V., and Martinez-Zapater, J.M., *High throughput snp discovery and genotyping in grapevine (vitis vinifera l.) by combining a re-sequencing approach and snplex technology*. BioMed Central Genomics, 2007. **8**.
134. Velasco, R., Zharkikh, A., Troggio, M., Cartwright, D.A., Cestaro, A., Pruss, D., Pindo, M., FitzGerald, L.M., Vezzulli, S., Reid, J., Malacarne, G., Iliev, D., Coppola, G., Wardell, B., Micheletti, D., Macalma, T., Facci, M., Mitchell, J.T., Perazzolli, M., Eldredge, G., Gatto, P., Oyzerski, R., Moretto, M., Gutin, N., Stefanini, M., Chen, Y., Segala, C., Davenport, C., Demattè, L., Mraz, A., Battilana, J., Stormo, K., Costa, F., Tao, Q., Si-Ammour, A., Harkins, T., Lackey, A., Perbost, C., Taillon, B., Stella, A., Solovyev, V., Fawcett, J.A., Sterck, L., Vandepoele, K., Grando, S.M., Toppo, S., Moser, C., Lanchbury, J., Bogden, R., Skolnick, M., Sgaramella, V., Bhatnagar, S.K., Fontana, P., Gutin, A., Van de Peer, Y., Salamini, F., and Viola, R., *A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety*. PLoS ONE, 2007. **2**(12): p. e1326.
135. Troggio, M., Malacarne, G., Coppola, G., Segala, C., Cartwright, D.A., Pindo, M., Stefanini, M., Mank, R., Moroldo, M., Morgante, M., Grando, M.S., and Velasco, R., *A dense single-nucleotide polymorphism-based genetic linkage map of grapevine (vitis vinifera l.) anchoring pinot noir bacterial artificial chromosome contigs*. Genetics, 2007. **176**(4): p. 2637-2650.
136. Owens, C.L., *Snp detection and genotyping in vitis*. Proceedings of the 8th International Conference on Grape Genetics and Breeding, Vols 1 and 2, 2003(603): p. 139-140.

137. Dong, Q.H., Cao, X., Yang, G.A., Yu, H.P., Nicholas, K.K., Wang, C., and Fang, J.G., *Discovery and characterization of snps in vitis vinifera and genetic assessment of some grapevine cultivars*. Scientia Horticulturae, 2010. **125**(3): p. 233-238.
138. Cabezas, J.A., Ibanez, J., Lijavetzky, D., Velez, D., Bravo, G., Rodriguez, V., Carreno, I., Jermakow, A.M., Carreno, J., Ruiz-Garcia, L., Thomas, M.R., and Martinez-Zapater, J.M., *A 48 snp set for grapevine cultivar identification*. BioMed Central Plant Biology, 2011. **11**.
139. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R., *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1977. **74**(12): p. 5463-5467.
140. Dereeper A Fau - Guignon, V., Guignon V Fau - Blanc, G., Blanc G Fau - Audic, S., Audic S Fau - Buffet, S., Buffet S Fau - Chevenet, F., Chevenet F Fau - Dufayard, J.F., Dufayard Jf Fau - Guindon, S., Guindon S Fau - Lefort, V., Lefort V Fau - Lescot, M., Lescot M Fau - Claverie, J.M., Claverie Jm Fau - Gascuel, O., and Gascuel, O., *Phylogeny.Fr: Robust phylogenetic analysis for the non-specialist*. Nucleic Acids Research, 2008. **36**(Web Server issue): p. W465-9.
141. Laucou, V., Lacombe, T., Dechesne, F., Siret, R., Bruno, J.P., Dessup, M., Dessup, T., Ortigosa, P., Parra, P., Roux, C., Santoni, S., Vares, D., Peros, J.P., Boursiquot, J.M., and This, P., *High throughput analysis of grape genetic diversity as a tool for germplasm collection management*. Theor Appl Genet, 2011. **122**(6): p. 1233-45.
142. Bowers, J., Boursiquot, J.M., This, P., Chu, K., Johansson, H., and Meredith, C., *Historical genetics: The parentage of chardonnay, gamay, and other wine grapes of*. Science, 1999. **285**(5433): p. 1562-1565.
143. Vouillamoz, J.F. and Grando, M.S., *Genealogy of wine grape cultivars: 'Pinot' is related to 'syrah'*. Heredity, 2006. **97**(2): p. 102-110.
144. Sefc, K.M., Regner, F., Turetschek, E., Glossl, J., and Steinkellner, H., *Identification of microsatellite sequences in vitis riparia and their applicability for genotyping of different vitis species*. Genome, 1999. **42**(3): p. 367-373.
145. Available from: <http://www.eu-vitis.de/index.php>.

Anexo

Anexo I

Tabela 1 – Preparação de soluções e reagentes

Na₂EDTA 0,5 M pH 8,0	Na ₂ EDTA (186,12g); água destilada (800mL). Ajustar o pH a 8,0 com NaOH e ajustar até ao volume final de 1L com água destilada.
TE 1x	10mM Tris-HCl (pH 8); 1mM EDTA (pH 8)
Solução de deposição (solução <i>stock</i>)	6x <i>loading buffer</i> – 0,25% azul de bromofenol; 0,25% xileno cianol FF e 30% de glicerol em água destilada
Solução de deposição (solução de trabalho)	Efetuar uma diluição de 1/5 em água destilada.
TAE 1x (solução de trabalho)	Adicionar 20mL de TAE 50x a 980 de água Milli-Q
TAE 50x (solução <i>stock</i>)	Tris base (242g); Na ₂ EDTA 0,5M, pH 8,0 (100mL); ácido acético glacial (57,1mL) água destilada (800mL). Misturar os componentes e ajustar até ao volume final de 1L com água destilada.

Anexo II

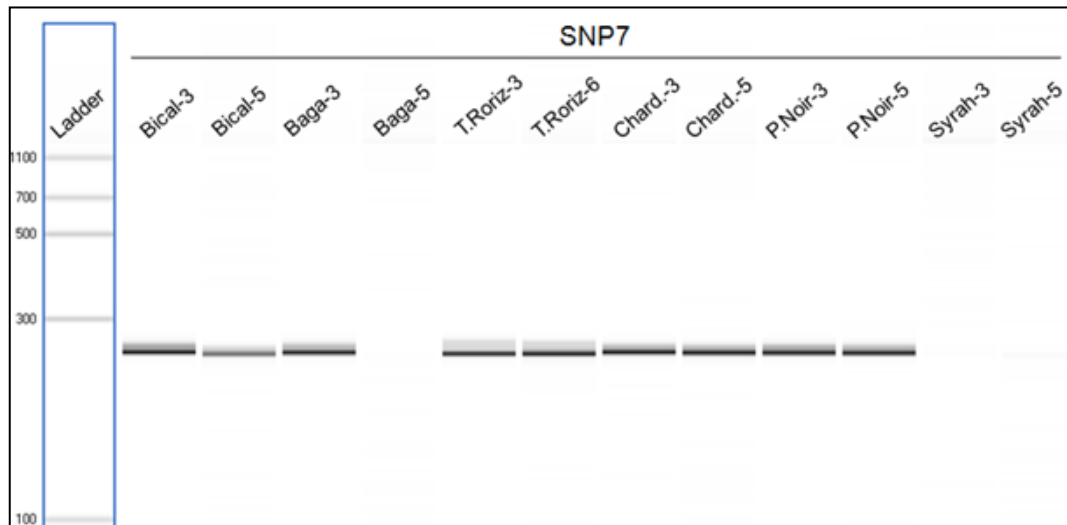


Figura 1 – Resultados resultantes das amplificações por PCR realizadas no LabChip para o SNP7

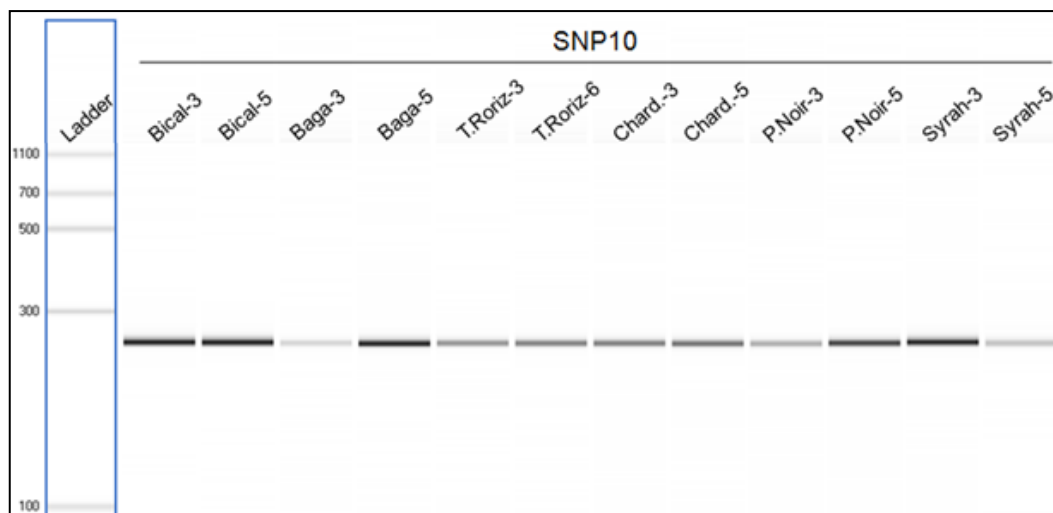


Figura 2 – Resultados resultantes das amplificações por PCR realizadas no LabChip para o SNP10

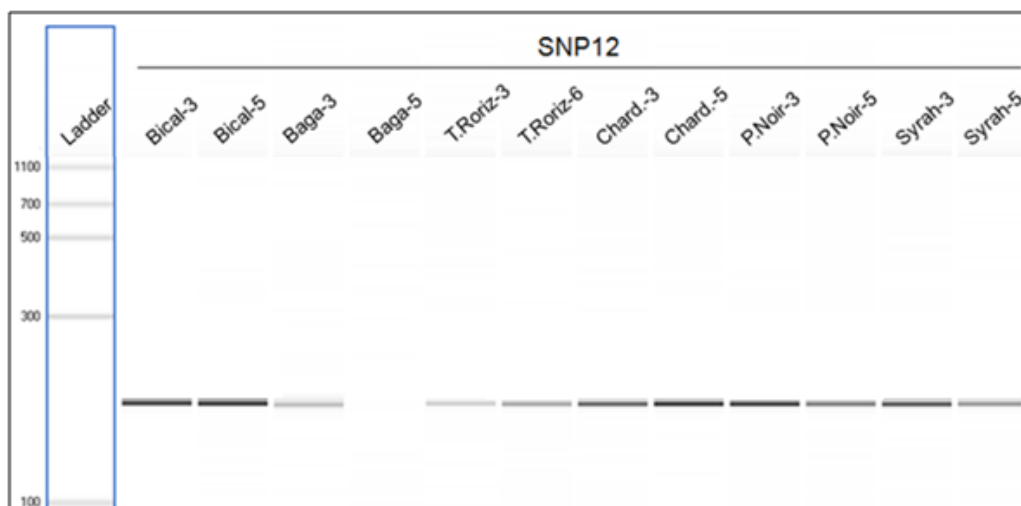


Figura 3 – Resultados resultantes das amplificações por PCR realizadas no LabChip para o SNP12

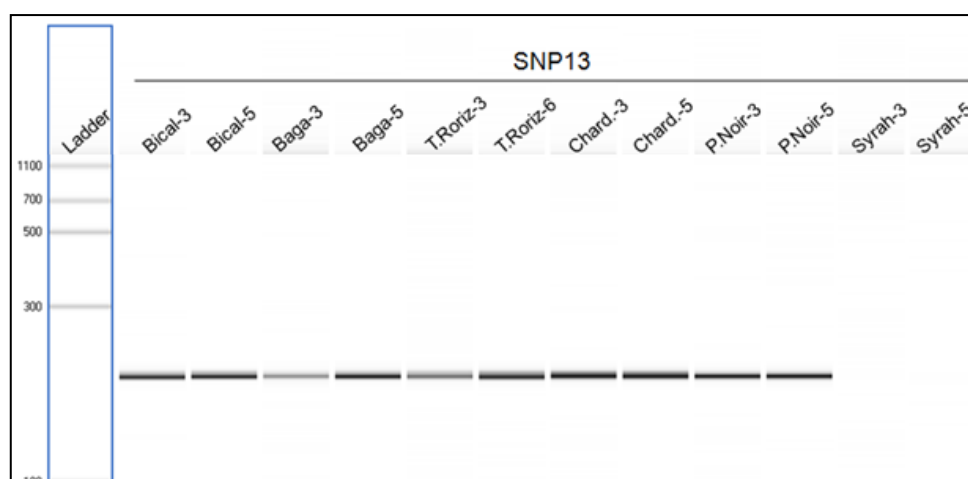


Figura 4 – Resultados resultantes das amplificações por PCR realizadas no LabChip para o SNP13

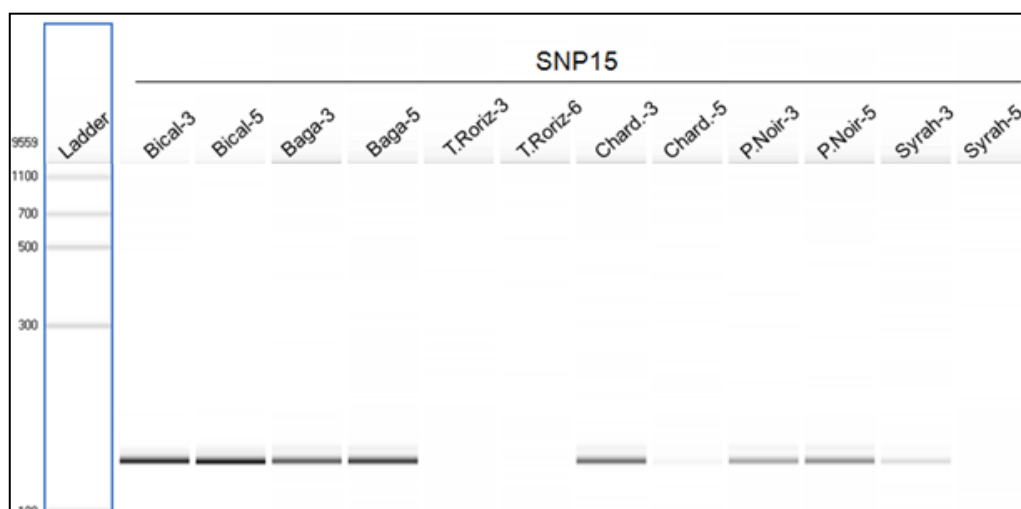


Figura 5 – Resultados resultantes das amplificações por PCR realizadas no LabChip para o SNP15

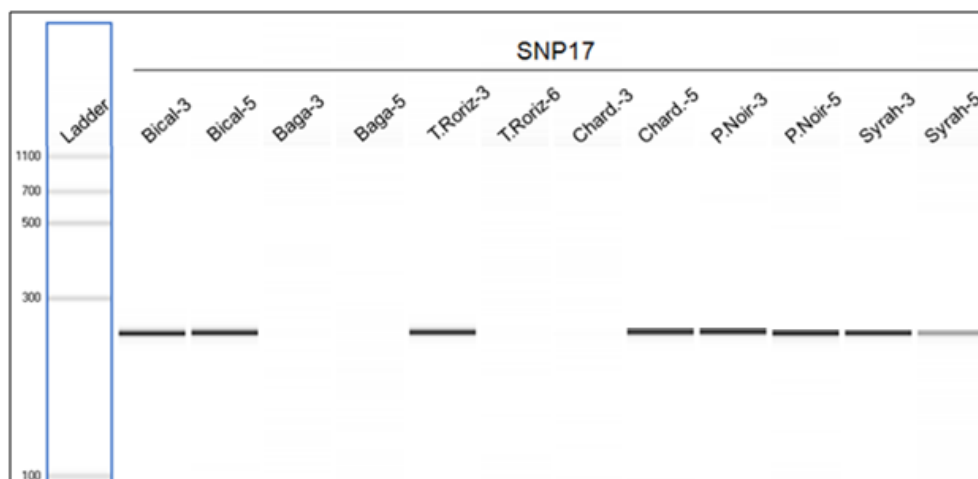


Figura 6 – Resultados resultantes das amplificações por PCR realizadas no LabChip para o SNP17

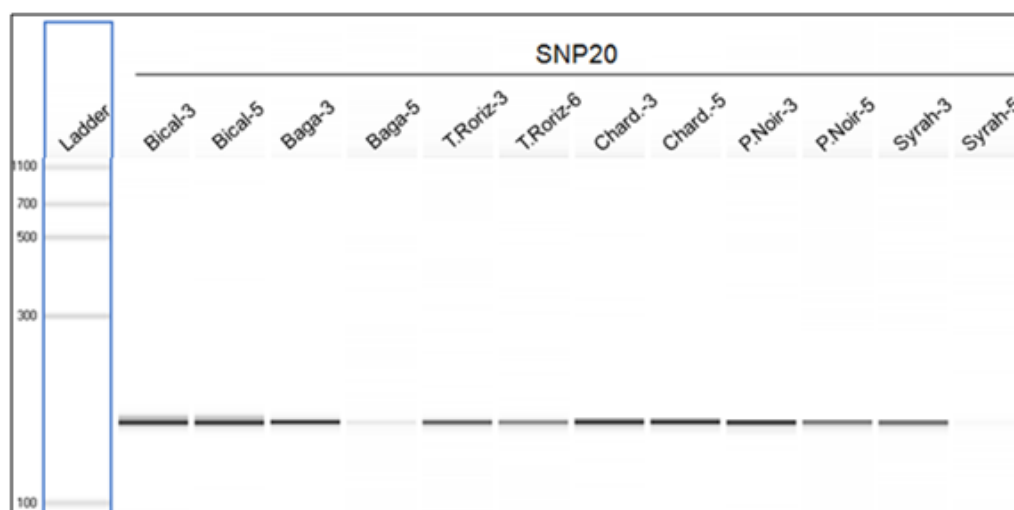


Figura 7 – Resultados resultantes das amplificações por PCR realizadas no LabChip para o SNP20

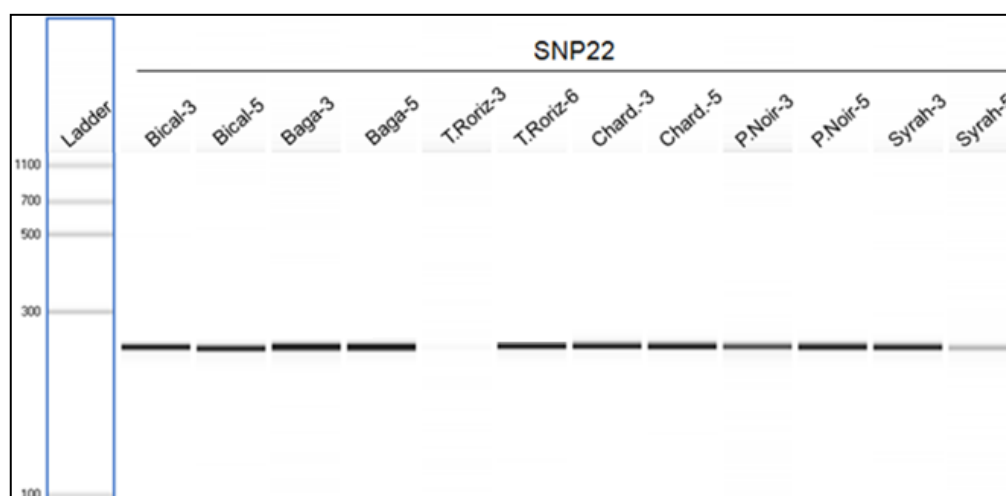


Figura 8 – Resultados resultantes das amplificações por PCR realizadas no LabChip para o SNP22

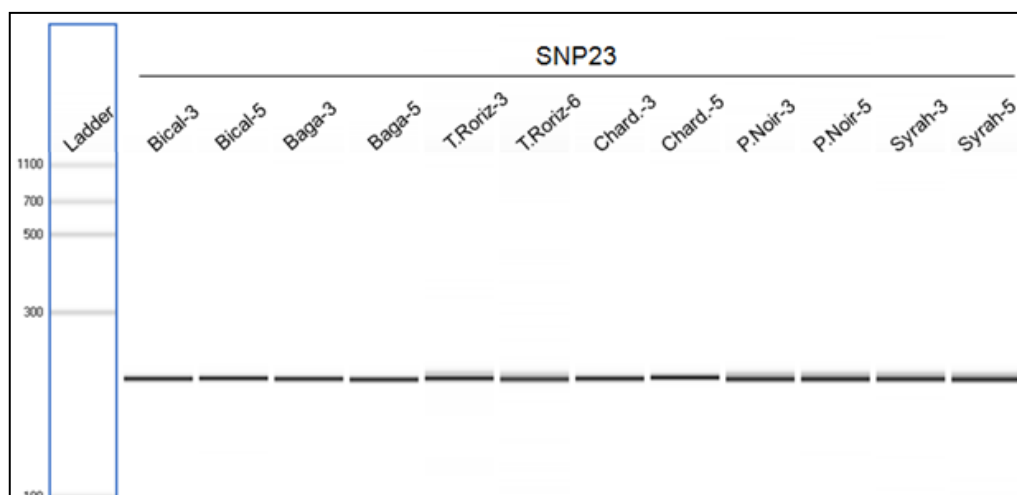


Figura 9 – Resultados resultantes das amplificações por PCR realizadas no LabChip para o SNP23

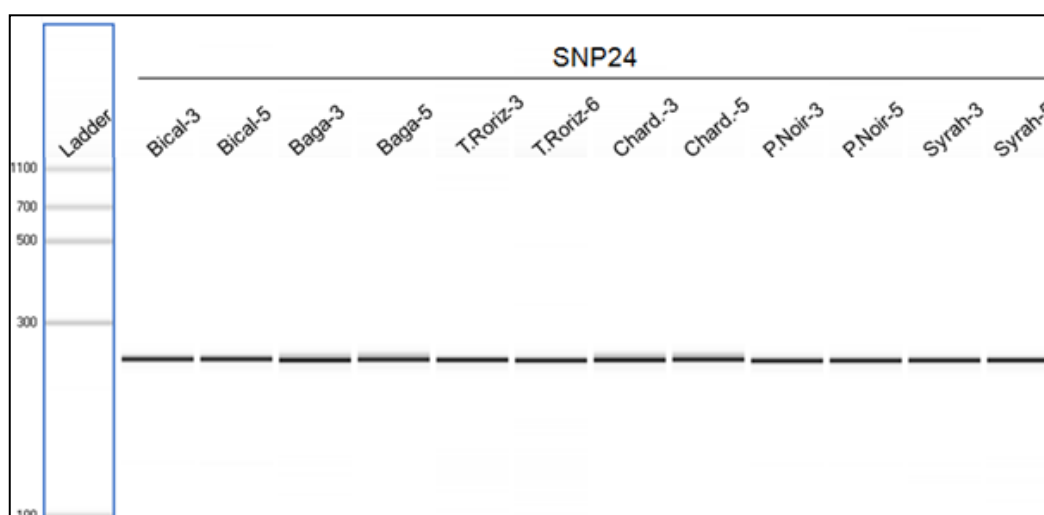


Figura 10 – Resultados resultantes das amplificações por PCR realizadas no LabChip para o SNP24

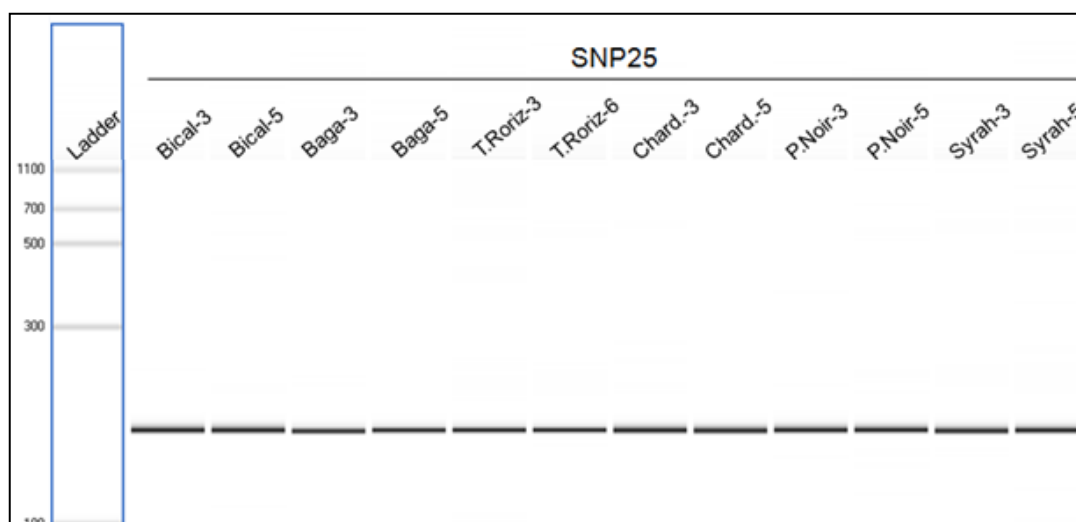


Figura 11 – Resultados resultantes das amplificações por PCR realizadas no LabChip para o SNP25

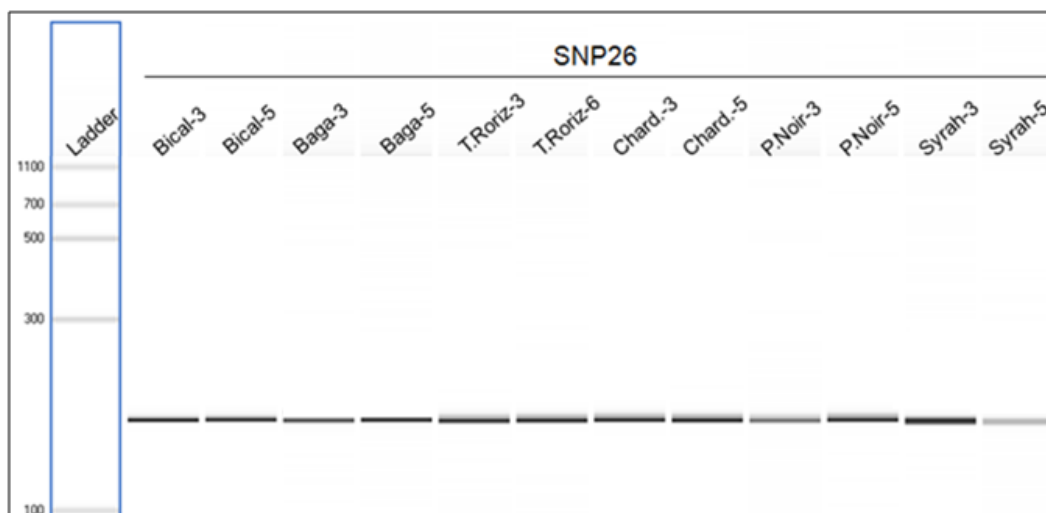


Figura 12 – Resultados resultantes das amplificações por PCR realizadas no LabChip para o SNP26



Figura 13 – Resultados resultantes das amplificações por PCR realizadas no LabChip para o SNP28

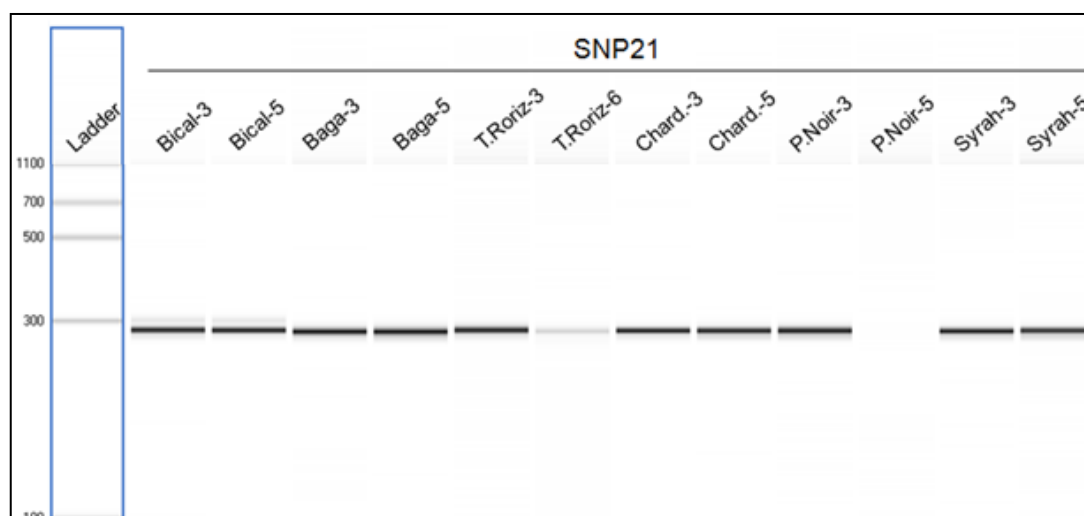


Figura 14 – Resultados resultantes das amplificações por PCR realizadas no LabChip para o SNP21

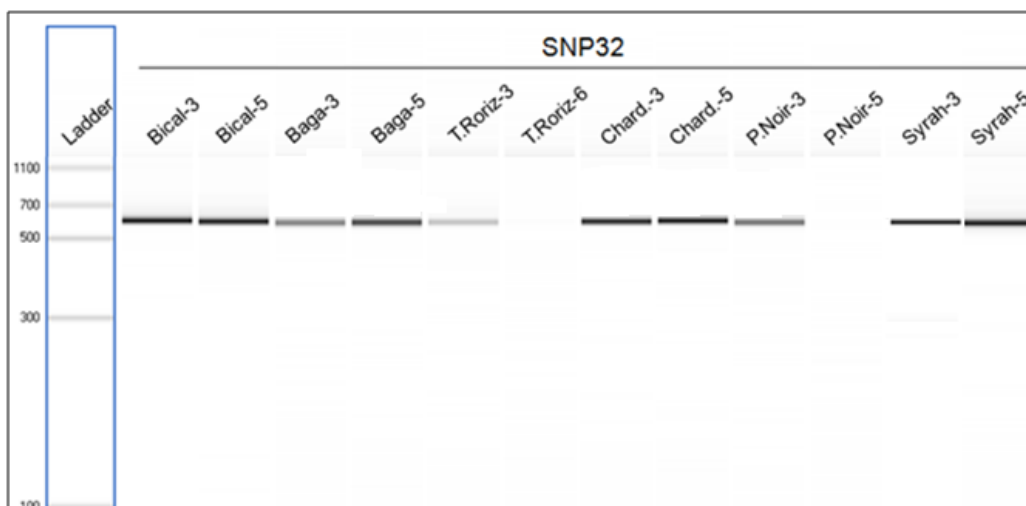


Figura 15 – Resultados resultantes das amplificações por PCR realizadas no LabChip para o SNP32

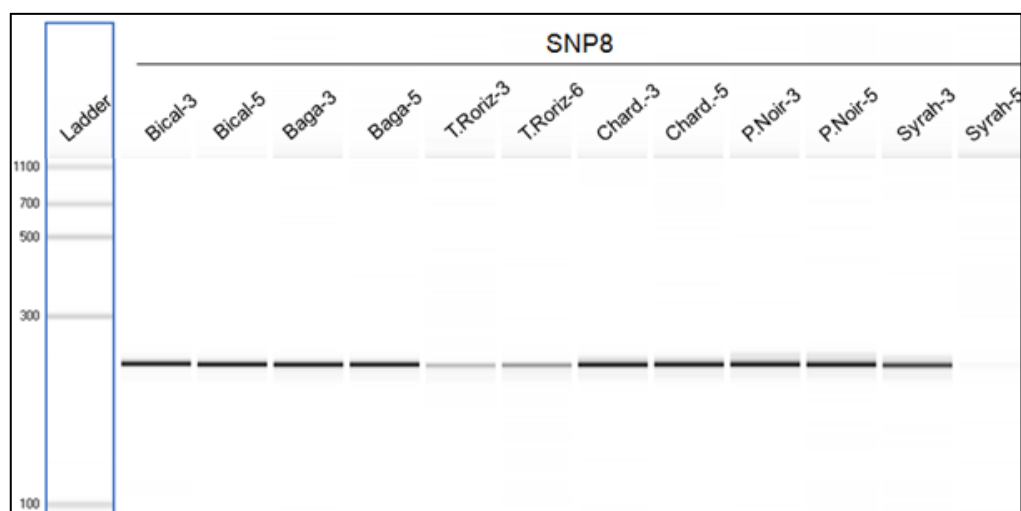


Figura 16 – Resultados resultantes das amplificações por PCR realizadas no LabChip para o SNP8

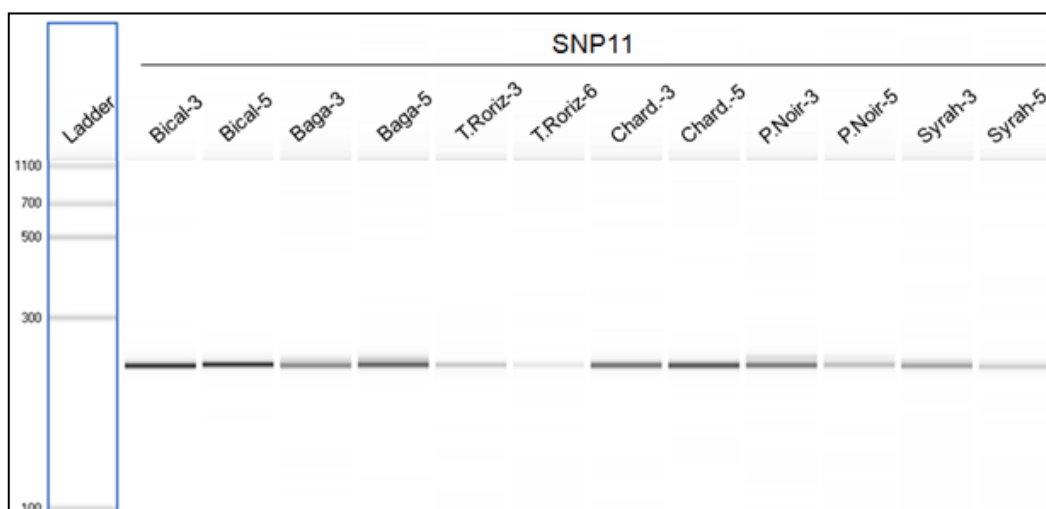


Figura 17 – Resultados resultantes das amplificações por PCR realizadas no LabChip para o SNP11

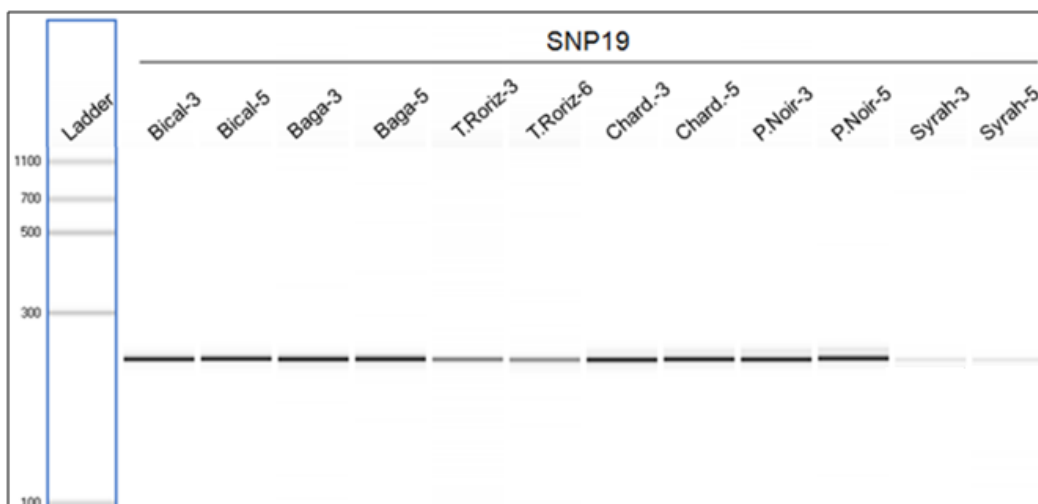


Figura 18 – Resultados resultantes das amplificações por PCR realizadas no LabChip para o SNP19

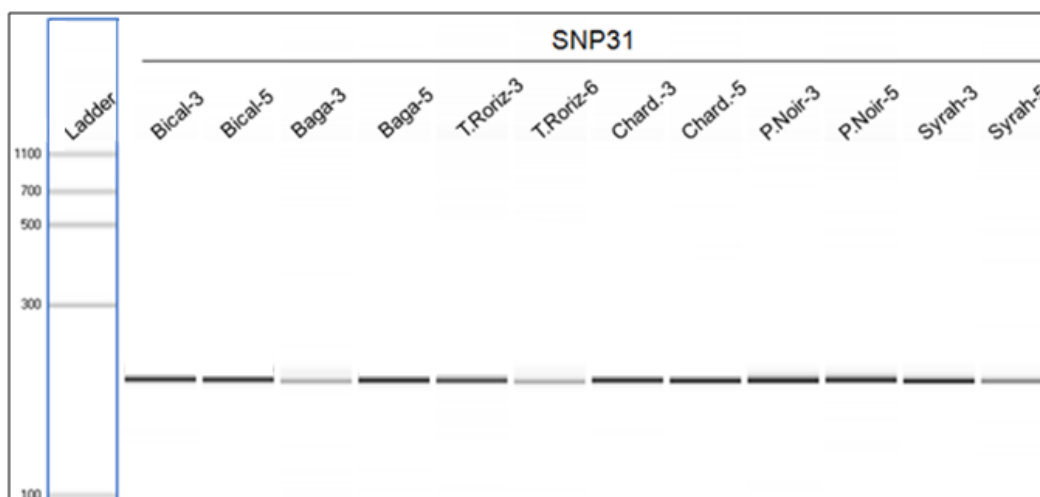


Figura 19 – Resultados resultantes das amplificações por PCR realizadas no LabChip para o SNP31

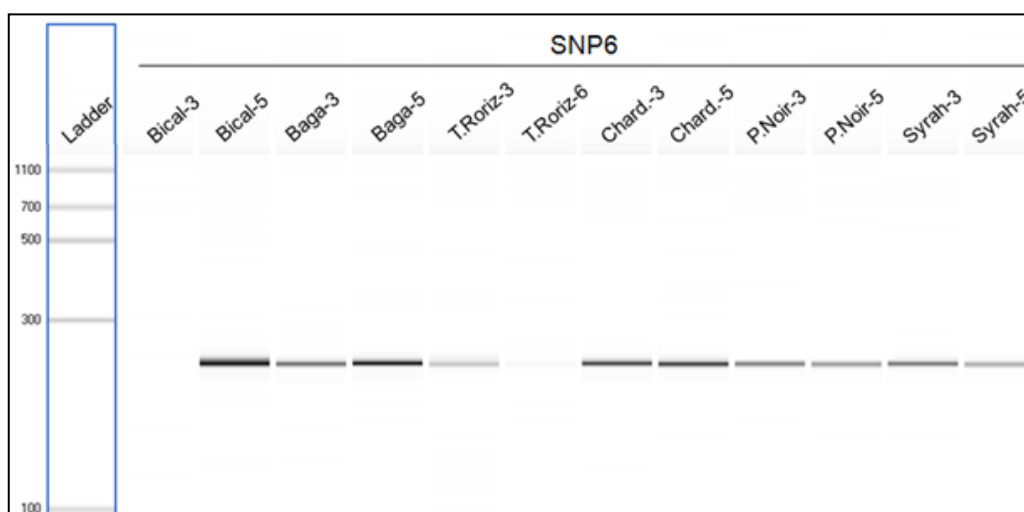


Figura 20 – Resultados resultantes das amplificações por PCR realizadas no LabChip para o SNP6

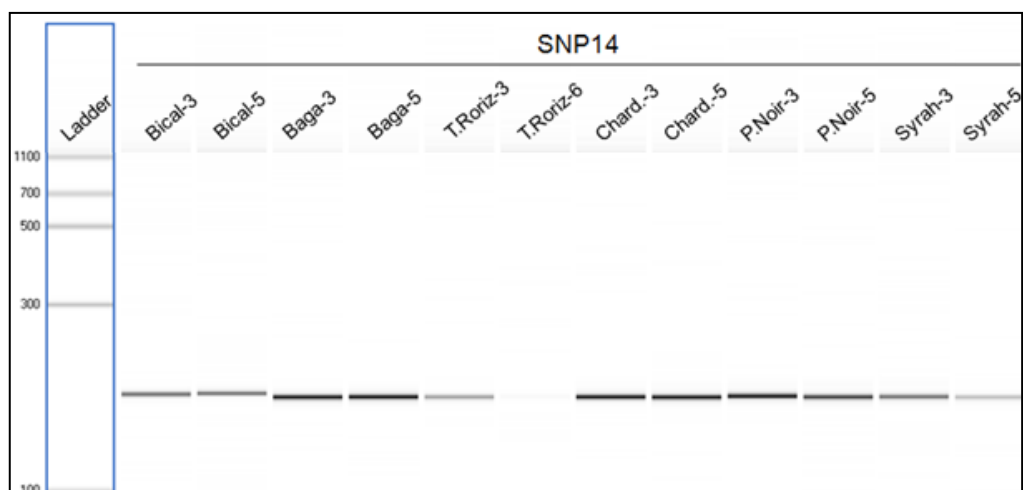


Figura 21 – Resultados resultantes das amplificações por PCR realizadas no LabChip para o SNP14

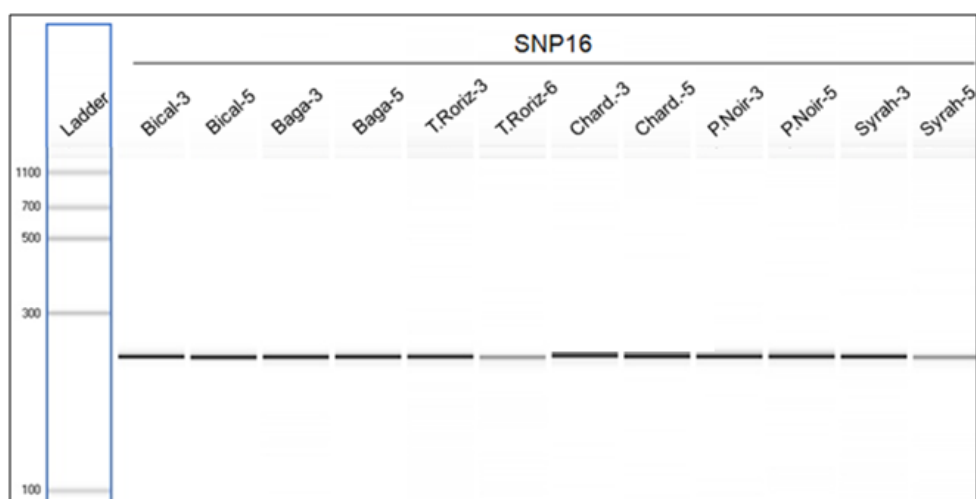


Figura 22 – Resultados resultantes das amplificações por PCR realizadas no LabChip para o SNP16

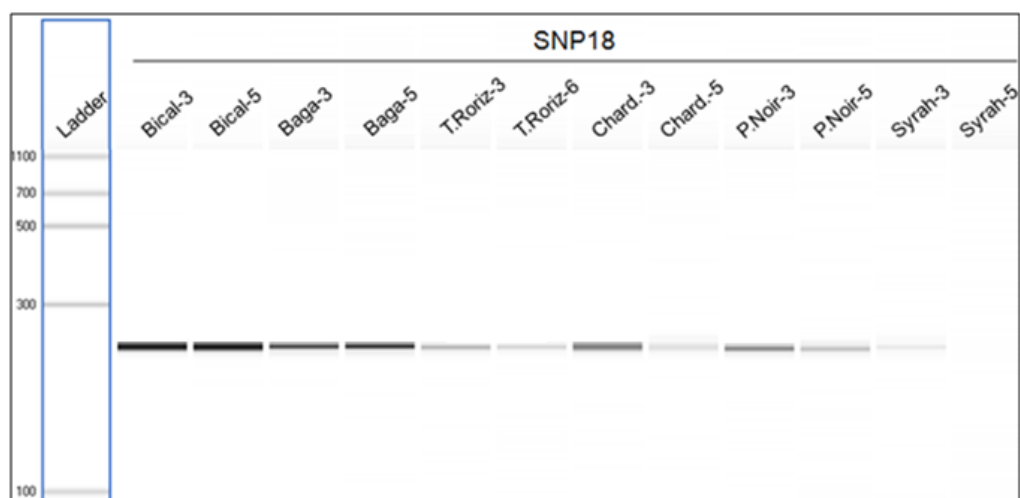


Figura 23 – Resultados resultantes das amplificações por PCR realizadas no LabChip para o SNP18

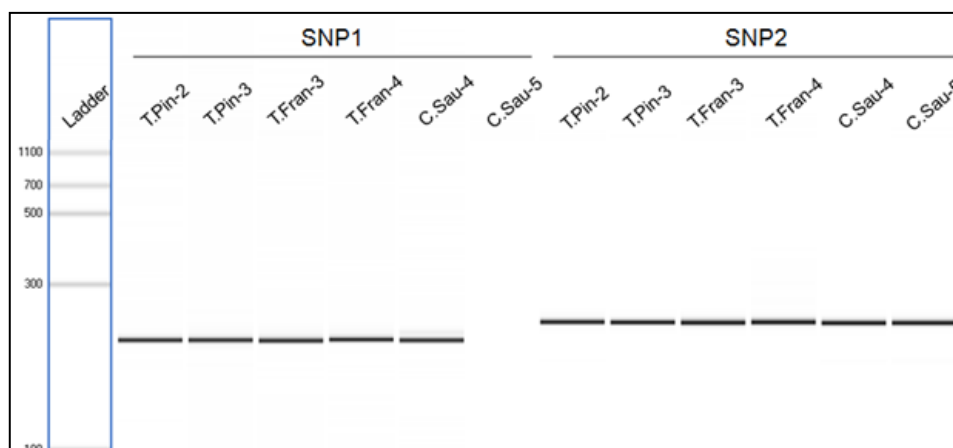


Figura 24 – Resultados resultantes das amplificações por PCR realizadas no LabChip para o SNP1 e SNP2

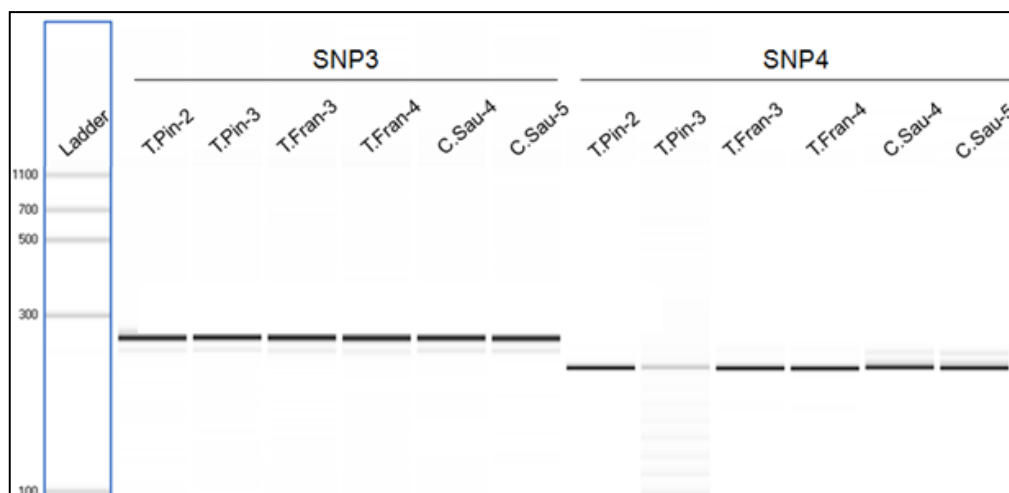


Figura 25 – Resultados resultantes das amplificações por PCR realizadas no LabChip para o SNP3 e SNP4

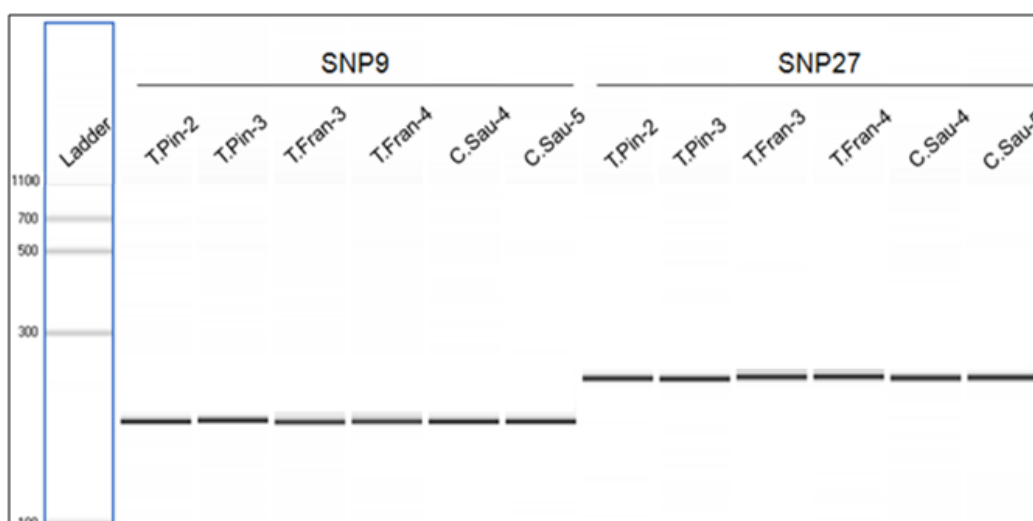


Figura 26 – Resultados resultantes das amplificações por PCR realizadas no LabChip para o SNP9 e SNP27

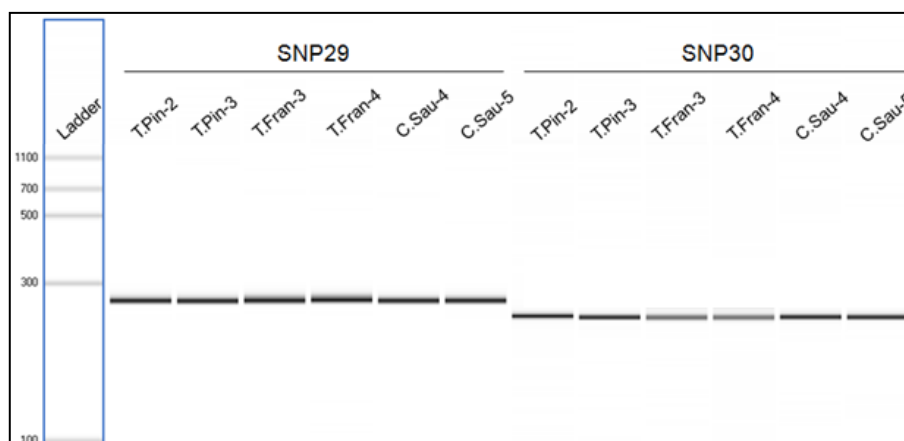


Figura 27 – Resultados resultantes das amplificações por PCR realizadas no LabChip para o SNP29 e SNP30

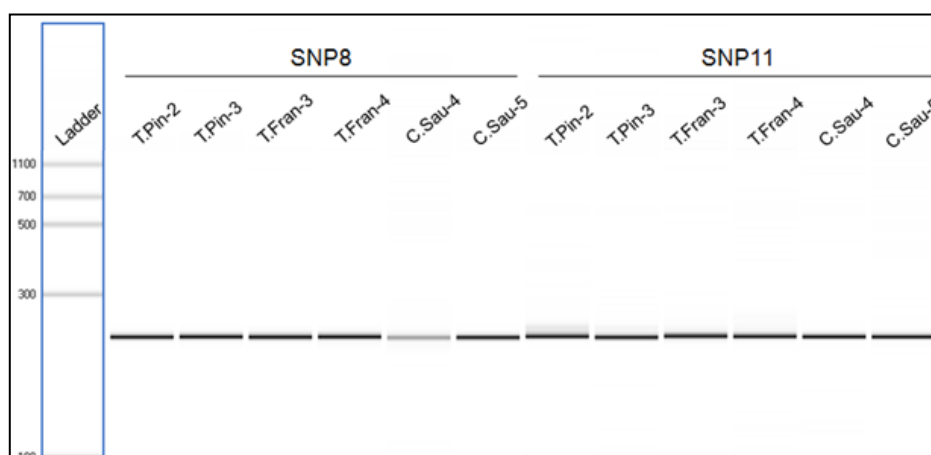


Figura 28 – Resultados resultantes das amplificações por PCR realizadas no LabChip para o SNP8 e SNP11

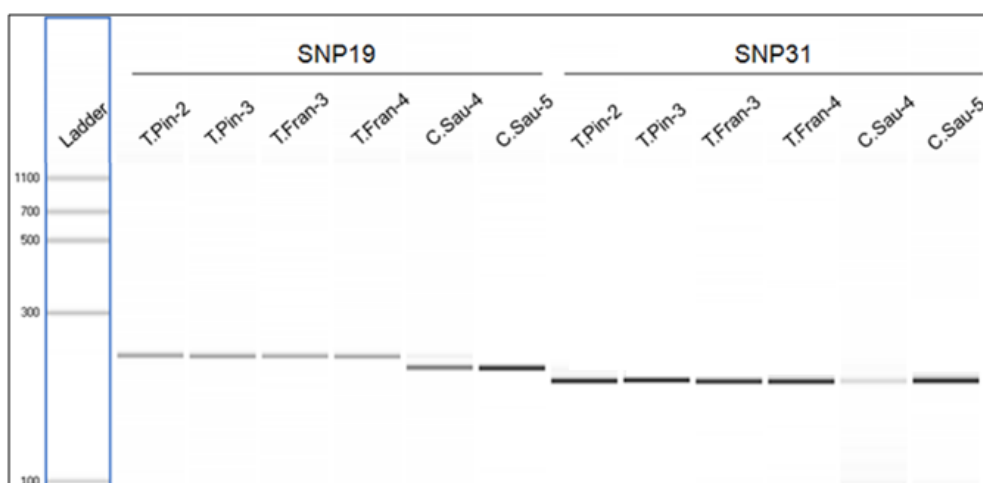


Figura 29 – Resultados resultantes das amplificações por PCR realizadas no LabChip para o SNP19 e SNP31



Figura 30 – Resultados resultantes das amplificações por PCR realizadas no LabChip para o SNP5

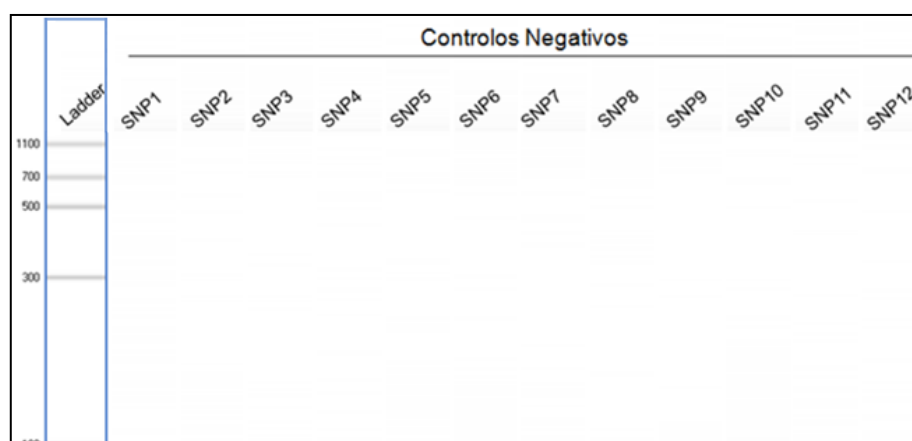


Figura 31 – Resultados resultantes das amplificações por PCR realizadas no LabChip para os controlos negativos para cada par de *primer* utilizado

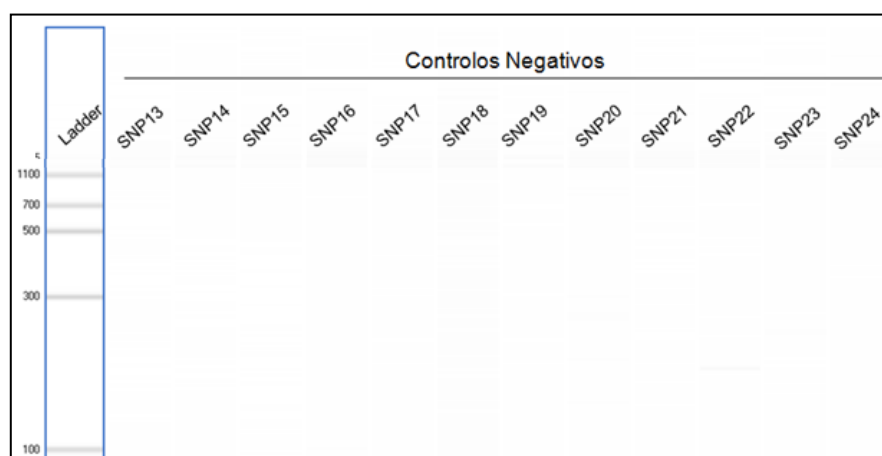


Figura 32 – Resultados resultantes das amplificações por PCR realizadas no LabChip para os controlos negativos para cada par de *primer* utilizado

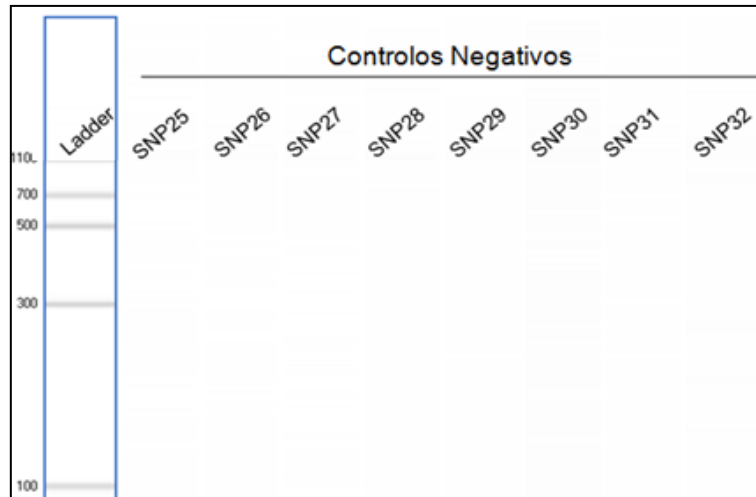


Figura 33 – Resultados resultantes das amplificações por PCR realizadas no LabChip para os controlos negativos para cada par de *primer* utilizado

Anexo III

Tabela 2 – Tamanho dos alelos obtidos para todas as amostras estudadas, para os 14 loci

	VVIh54		VVIq52		VVMD5		VVMD7		VrZAG79		VVIhb01		VVMD25		VVMD27		VVMD32		VVS2		VrZAG62		VVIIn16		VVIp60		VVMD28	
Syrah-3	162	164	83	83	222	228	235	235	244	250	289	293	238	238	184	186	239	271	129	129	185	191	148	150	314	314	215	225
Syrah-5	162	163	83	83	222	228	235	235	244	250	289	293	238	238	184	186	239	271	129	129	185	191	148	150	314	315	215	225
Baga-3	163	165	79	79	228	236	235	235	246	250	289	289	252	252	175	184	251	259	139	152	185	201	148	150	302	318	233	233
Baga-5	163	165	79	79	228	236	235	235	246	250	289	289	252	252	174	184	251	259	139	152	185	201	148	150	302	318	233	233
Chard-3	162	165	76	83	230	234	235	239	242	244	287	293	236	252	177	184	239	271	133	139	185	193	148	148	315	318	215	225
Chard-5	162	165	77	83	230	234	235	239	242	244	287	293	236	252	177	184	239	270	133	139	185	193	148	148	315	318	215	225
P.Noir-3	162	165	83	83	224	234	235	239	238	244	287	293	236	246	181	184	239	271	133	148	185	191	148	156	314	316	215	233
P.Noir-5	161	166	83	83	224	234	235	239	238	244	287	293	236	246	181	184	239	271	133	148	185	191	148	156	314	316	215	233
Bical-3	164	164	79	83	222	236	236	259	250	250	287	289	236	238	175	181	251	271	129	142	185	191	150	150	318	322	231	255
Bical-5	164	164	79	83	222	236	236	259	250	250	287	289	236	238	175	181	251	271	129	142	185	191	150	150	318	322	232	255
T.Roriz-3	162	166	81	87	222	228	247	253	246	250	289	293	238	246	175	185	249	251	129	148	191	197	148	150	302	318	233	246
T.Roriz-6	162	166	81	87	222	228	247	253	246	250	289	293	238	246	175	185	249	251	129	148	191	197	148	150	302	318	233	246
T-16	164	166	79	83	222	232	236	236	244	244	293	293	246	252	177	185	239	271	140	148	185	191	148	148	316	316	231	265
T-17	164	166	79	83	222	232	236	236	244	244	293	293	246	252	177	184	239	270	139	148	185	191	148	148	316	316	231	265
T-18	164	166	79	83	222	232	236	236	244	244	293	293	246	252	177	184	239	271	139	148	185	191	148	148	316	316	231	265
T-19	164	166	79	83	222	232	236	236	244	244	293	293	246	252	177	184	239	271	139	148	185	191	148	148	316	316	231	265
T-21	164	166	79	83	222	232	236	236	244	244	293	293	246	252	177	184	239	270	139	148	185	191	148	148	316	316	231	265
T-22	164	166	79	83	222	232	236	236	244	244	293	293	246	252	177	184	239	271	139	148	185	191	148	148	316	316	231	265
T-23	164	166	79	83	222	232	236	236	244	244	293	293	246	252	177	184	239	271	139	148	185	191	148	148	316	316	231	265
T-112	164	166	79	83	222	232	236	236	244	244	293	293	246	252	177	185	239	271	139	148	185	191	148	148	316	316	231	265
T.Fran-3	164	166	79	83	222	224	236	239	244	246	289	293	246	252	177	179	239	270	139	148	189	191	148	148	314	316	231	251
T.Fran-4	164	166	79	83	222	224	236	239	244	246	289	293	246	252	177	179	239	270	140	148	189	191	148	148	314	316	231	251
C.Sau-4	164	177	77	83	228	236	236	236	246	246	289	289	236	246	185	185	239	239	135	148	185	191	150	150	302	310	231	233
C.Sau-5	164	175	77	83	228	236	236	236	246	246	289	289	236	246	184	184	239	239	135	148	185	191	150	150	302	310	231	233
T.Pin-3	162	164	79	83	222	232	236	253	246	246	287	305	236	236	177	185	255	271	129	154	185	191	148	150	316	316	246	255
T.Pin-4	162	164	79	83	222	232	236	253	246	246	287	305	236	236	177	185	255	271	129	154	185	191	148	150	316	316	246	255

